

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Estudo da infeção por PCV2 em soros de suíno, através da
comparação de valores de anticorpos específicos e
quantificação de DNA viral por qPCR**

Cátia Alexandra Santos Moiteiro

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada por:
Professora Doutora Ana Duarte
Professora Doutora Maria Filomena Caeiro

2016



**Estudo da infeção por PCV2 em soros de suíno, através da
comparação de valores de anticorpos específicos e quantificação
de DNA viral por qPCR**

Cátia Alexandra Santos Moiteiro

Ano 2016

O trabalho apresentado nesta dissertação de mestrado foi realizado no laboratório SOCLAB sob orientação da Professora Doutora Ana Duarte no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Professora Doutora Maria Filomena Caeiro foi designada como orientadora interna no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada pela Faculdade de Ciências de Lisboa.

Agradecimentos

São várias as pessoas que contribuíram para que esta dissertação fosse possível e a todos gostaria de deixar o meu mais sincero obrigada!

Em primeiro lugar quero agradecer à prof Doutora Ana Duarte, minha orientadora externa, pela excelente orientação, por todos os ensinamentos e suporte sempre que precisei, por todo o tempo dispensado e que, sem me conhecer decidiu aceitar a proposta para me ajudar nesta etapa.

À prof Doutora Maria Filomena Caeiro, minha orientadora interna, pela orientação, pelos conhecimentos transmitidos e por se ter mostrado sempre disponível para me ajudar.

A equipa da SOCLAB, aos que permanecem, aos que passaram provisoriamente (aos estagiários), em especial à Inês por me ter dado a oportunidade de fazer parte da equipa e por me ter aturado tantos e tantos dias e ter-me acalmado e ajudado quando tudo parecia ruir. À Dr^a Beta e ao Dr^o Pedro por me terem recolhido as amostras e à gerência, Eng^o Nuno, por ter permitido a realização deste estudo.

Ao André, o meu amor, por ter tido a paciência de um Santo durante todo este tempo, por ter acreditado mais em mim do que eu própria, por nunca ter desistido de me ajudar, obrigada por tudo! Isto também é um bocadinho teu!

À minha família, embora de formas diferentes todos me ajudaram à sua maneira.

A todos os professores e colegas que contribuíram de alguma forma para a minha formação.

A todos aqueles a quem eu não dei a atenção que devia, nem dispensei o tempo que mereciam, desculpem e obrigada pela compreensão.

Enfim, a todos os que me ajudaram durante o tempo da realização do mestrado, direta ou indiretamente, obrigada!

Resumo

O circovírus suíno (PCV) pertence à família *Circoviridae* e ao género *Circovirus*. Foi descrito a primeira vez na década de 70 por Tischer como um contaminante de células de rim suíno PK-15, não citopatogénico. Duas décadas depois foi detetado, através de estudos genéticos, uma nova variante vírus, denominada de PCV2. O PCV2 é um vírus de pequenas dimensões, de genoma de DNA de cadeia simples circular e sem invólucro. O virião é resistente quando exposto a ambientes ácidos, a temperaturas entre 56 °C e 70 °C, à congelação, à luz ultra violeta e a desinfetantes. É um vírus altamente contagioso, tendo sido isolado em todos os continentes. Está associado a uma síndrome de emagrecimento pós-desmame (PMWS) em suínos, que induz um quadro sintomatológico caracterizado por perda de peso, crescimento deficiente e alta taxa de mortalidade. Estas alterações causam elevados prejuízos nas explorações afetadas, sendo por isso de extrema importância o seu controlo e deteção, de forma a evitar ou minimizar quebras na produção suinícola. O controlo da infeção natural nas explorações suinícolas é na maior parte das vezes realizado recorrendo-se a métodos ELISA que detetam a presença de anticorpos; contudo, a presença de anticorpos específicos é indicativa de contacto com o vírus, mas não de infeção.

O objetivo desta dissertação consistiu em avaliar a relação entre os anticorpos anti PCV2 detetados através do método ELISA e a quantificação de carga viral obtida por PCR quantitativo. Para isto, as amostras recolhidas para este estudo foram provenientes de suínos não vacinados contra o PCV2 e com idades superiores a 20 semanas, de forma a garantir que já não possuíam imunidade passiva (anticorpos maternos), contra este vírus. Numa primeira abordagem, as amostras de soros foram analisadas com o *kit* comercial ELISA PCV2 (*Ingezim*), fazendo a distinção entre anticorpos IgG e IgM. Posteriormente foram selecionadas amostras com diversos valores de IgG/IgM anti PCV2 e analisadas por PCR quantitativo, para deteção de DNA viral.

Os resultados obtidos mostraram que a maioria dos animais são positivos para o vírus, não tendo sido detetada nenhuma relação entre o tipo de infeção (ratio IgG/IgM obtido pelo método ELISA) e a quantificação de DNA viral de PCV2. Muito provavelmente o tipo de anticorpos detetados pelo método ELISA utilizados neste estudo não serão anticorpos neutralizantes, não exibindo atividade neutralizante sobre a infeção viral.

Palavras-chave: PCV2, suíno, ELISA, PCR quantitativo, diagnóstico

Abstract

The porcine circovirus (PCV) is included in the family *Circoviridae*, gender *Circovirus*. It was described for the first time in the decade 70 by Tischer as a non-cytopathogenic virus. Two decades after, a new variant of the virus was detected and designated as PCV2. It's a small non-enveloped virus, with a circular single strand DNA genome. The virion is resistant whenever exposed to acid environments, to temperatures between 56 °C and 70 °C, to freezing, ultra violet light and disinfectants. It's a highly contagious virus, worldwide distributed, responsible for the post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in swines characterized by weight loss, undergrowth, and high mortality rate. PMWS causes high losses in the affected farms, being therefore of extreme importance its control and detection, to avoid or minimize breaks in pig production.

The control of the natural infection in pig farms, is mainly performed by ELISA methods that detect the presence of antibodies; however, the presence of specific antibodies indicates contact with the virus, but not viral presence.

The objective of this dissertation consisted in the evaluation of the detection specific antibodies anti PCV2 obtained through the ELISA method and the quantification of the viral load obtained by quantitative PCR. For this, the collected samples for this study were from non-vaccinated pigs against PCV2 with ages above 20 weeks, so as to ensure the absence of passive immunity against this virus.

In a first approach, the samples of serum were analyzed with the commercial kit PCV2 ELISA (Ingezim), making the distinction between IgG and IgM antibodies. Posteriorly later on selected samples with diverse ratios of IgG/IgM anti PCV2 antibodies were analyzed by quantitative PCR, for detection and quantitation of viral DNA.

The obtained results showed that the majority of the animals were virus positive, however no relationship was found between the type of infection classified by ELISA and the quantification of the viral DNA. Most likely the antibodies detected by the ELISA are not neutralizing antibodies, without a neutralizing effect on the virus infection.

Key word: PCV2, porcine, ELISA, quantitative PCR, diagnosis

Índice geral

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract	iii
Índice geral.....	iv
Índice de figuras	v
Índice de tabelas	vi
Lista de abreviaturas.....	viii
1. Introdução.....	1
1.1. Breve resumo histórico do circovírus.....	1
1.2. Etiologia	2
1.2.1. Taxonomia.....	2
1.2.2. Propriedades físicas e biológicas.....	2
1.2.3. Organização morfológica e molecular	3
1.3. Replicação	4
1.4. Epidemiologia	5
1.5. Patogénese/ Sistema imunitário	6
1.6. Técnicas de Diagnóstico.....	7
1.6.1. Detecção de anticorpos no soro	8
1.6.1.1. Imunofluorescência e imunocitoquímica indireta	8
1.6.1.2. Soroneutralização	8
1.6.1.3. Ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática.....	9
1.6.2. Detecção de antígeno viral.....	10
1.6.2.1. Isolamento do vírus	10
1.6.2.2. Imunohistoquímica e imunocitoquímica.....	11
1.6.2.3. Microscopia eletrónica	11
1.6.2.4. Imunofluorescência direta	11

1.6.2.5. ELISA de captura antigénica.....	11
1.6.2.2. Detecção de ácido nucleico.....	12
1.6.2.2.1. Hibridação in situ	12
1.6.2.2.2. Reação de cadeia pela polimerase	12
1.7. Objetivo do estudo	14
2.Trabalho experimental – Detecção de PCV2 em soros de suínos.....	15
2.1. Materiais e métodos	15
2.1.1. Amostras.....	15
2.1.2. Método ELISA PCV2	15
3.1.3. Método qPCR.....	17
3.1.3.1. Extração e purificação do DNA	17
2.1.3.2. Amplificação do DNA viral por qPCR	18
3. Resultados	21
3.1. ELISA.....	21
3.2. qPCR	23
3.1. Discussão dos resultados.....	27
4. Conclusão	31
5. Referências bibliográficas	32
Anexo I- Leituras ELISA	37
Anexo II- Leituras qPCR.....	39

Lista de figuras

Figura 1.1: Família <i>Circoviridae</i> . Adaptado de www.ictvonline.org	2
Figura 1.2: Representação esquemática do genoma do circovírus suíno. Adaptado de Faurez <i>et al.</i> , 2009.....	4

Figura 1.3: Ciclo de replicação do PCV. 1- conversão de ssDNA para dsDNA; 2- replicação pelo mecanismo de círculo rolante; 3- transcrição; 4- tradução; 5- ssDNA serve de molde para novo ciclo de replicação; 6- ssDNA é transportado para o citoplasma; 7- encapsidação. Adaptado de Zhai, 2004	5
Figura 1.4: Mecanismo de funcionamento da sonda Taqman®. Adaptado de Arya <i>et al.</i> , 2005	13
Figura 2.1: Esquematização do método utilizado (Adaptada da ficha técnica do método, acedida em: www.ingenasa.es)	16
Figura 3.1: Tipo de infeção por exploração. Azul- infeção ativa, vermelho- infeção recente, verde- infeção tardia e roxo- sem infeção	22
Figura 3.2: A- Resultados ELISA: 90 animais apresentaram infeção e 15 não apresentaram infeção. B- 2 animais apresentaram infeção ativa, 28 animais infeção recente e 60 animais infeção tardia	23
Figura 3.3: Curvas de calibração obtidas através de 7 diluições seriadas do DNA padrão. A- EA= 0.93; B- EA= 0.94; C- EA= 0.96; D-EA= 0.93.	24
Figura 3.4: A- Quantificação obtida por qPCR das amostras classificadas como infeção recente por ELISA. B- Quantificação obtida por qPCR das amostras classificadas como infeção tardia por ELISA	26

Lista de tabelas

Tabela 2.1: Relação entre a densidade ótica de 450 nm de IgM e de IgG com o tipo de infeção correspondente.....	17
Tabela 2.2: Critérios de validação do ensaio ELISA	17
Tabela 2.3: Alvos utilizados no sistema de quantificação de DNA	18
Tabela 2.4: Programa de amplificação	19
Tabela 2.5: Diluições seriadas de DNA controlo para composição da curva padrão	19
Tabela 2.6: Critérios de validação do ensaio qPCR.....	20

Tabela 3.1: Valores de cut off obtidos em cada ensaio ELISA. Exploração A- IgM 1,057, IgG 0,901; Exploração B- IgM 0,904, IgG 0,712; Exploração C- IgM 0,795, IgG 0,597.....	21
Tabela 3.2: Número de amostras testadas por ELISA por exploração e tipo de infecção por exploração	22
Tabela 3.3: Critério de escolha de amostras analisadas por qPCR	23
Tabela 3.4: Valores Ct obtidos pela sonda marcada com VIC, no qPCR. Ensaio 1- 28,12; ensaio 2- 28,29; ensaio 3- 28,09; ensaio 4- 27,83	25

Lista de abreviaturas

aa- Aminoácido

ac- Anticorpo

BFDV- Circovírus do bico e das penas

CaCV- Circovírus do canário

Cap- Proteína da cápside

CAV- Circovírus da anemia da galinha

CoGV- Circovírus do ganso

dsDNA- DNA de cadeia dupla

DO- Densidade ótica

DuCV- Circovírus do pato

EA- Eficiência da amplificação

FiCV- Circovírus do tentilhão

GuCV- Circovírus da gaivota

Ig- Imunoglobulina

nt- Nucleótidos

PCV- Circovírus suíno

PCV1- Circovírus suíno tipo 1

PCV2- Circovírus suíno tipo 2

PiCV- Circovírus do pombo

PMWS- Síndrome de emagrecimento pós-desmame

RCR- Mecanismo de círculo rolante

Rep- Proteína Replicase

RF- Intermediário replicativo

NCS- Controlo negativo de extração

ORFs- Grelhas de leitura aberta

Ori- Origem de replicação

ssDNA- DNA de cadeia simples

StCV- Circovírus do estorninho

SwCV- Circovírus do cisne

1. Introdução

1.1. Breve resumo histórico do circovírus

O circovírus suíno (*Porcine circovirus* – PCV) foi descrito pela primeira vez por Tischer, na década de 70, na Alemanha, através de microscopia eletrónica, como sendo um vírus morfológicamente semelhante ao picornavírus, não citopatogénico, que causava infeções persistentes em culturas de células de rim de suíno PK-15 (Ellis *et al.*, 1998; Allan *et al.*, 2000; Opriessnig *et al.*, 2007).

Uma década mais tarde, verificaram que estes vírus possuíam um genoma de DNA de cadeia simples, circular, justificando a denominação atual de circovírus suíno (Ellis *et al.*, 1998; Allan *et al.*, 2000; Opriessnig *et al.*, 2007).

Na década de 90, no Canadá surgiu um surto num grupo de animais da recria que causava emagrecimento, alterações respiratórias, palidez, icterícia e infiltração granulomatosa dos tecidos linfoides. Este surto foi nomeado como síndrome de emagrecimento pós-desmame (PMWS), tendo sido detetada a presença de anticorpos anti-PCV (ac anti- PCV2) nos animais afetados (Ellis *et al.*, 1998; Opriessnig *et al.*, 2007). Após este episódio, vários relatos foram feitos por todo o mundo que evidenciavam a presença da doença na maioria das explorações de suínos (Madec *et al.*, 2008).

Através de estudos genéticos realizados em animais com PMWS, verificou-se que a variante do PCV isolado nestes animais, apresentava cerca de 68 % de similaridade com o vírus não patogénico isolado nas células PK-15. Este facto, sugeriu a existência de uma nova variante do vírus, tendo sido denominado como circovírus suíno tipo 2 (PCV2), o vírus associado a PMWS e como circovírus suíno tipo 1 (PCV1), não patogénico (Hamel *et al.*, 1998; Meehan *et al.*, 1998).

Estudos realizados indicam que o PCV2 já se encontrava na população suinícola muito tempo antes de ser identificado pela primeira vez. Jacobsen (2009) confirmou por hibridação *in situ* e PCR, que o vírus já estava presente na população de suínos da Alemanha pelo menos desde o ano de 1962, sendo esta a data mais antiga referente à sua deteção. Outro estudo realizado no Reino Unido em tecidos conservados referentes aos anos 70, 80 e 90, revelou a existência de ácidos nucleicos específicos do PCV2, confirmando que este vírus ou um vírus similar já estava presente pelo menos 20 anos antes do aparecimento do surto da década de 90 (Opriessnig *et al.*, 2007).

Atualmente o PCV2 está dividido em três genótipos, identificados em todo o mundo: PCV2a e PCV2b que estão associados a PMWS e PCV2c que foi identificado em animais saudáveis, na Dinamarca. Até ao ano de 2003, os dois primeiros genótipos apresentavam uma distribuição geral, embora nos Estados Unidos e Canadá só tenha sido identificado o PCV2a. Apesar da sua ausência na América do Norte, a partir desta data, o PCV2b começou a ser o genótipo predominante no Mundo (Meng *et al.*, 2013).

1.2. Etiologia

1.2.1. Taxonomia

Atualmente e de acordo com o Comité Internacional de Taxonomia dos vírus foram incluídos na família *Circoviridae* o género *Circovirus* e *Gyrovirus* (Mankertz *et al.*, 2004; www.ictvonline.org).

O PCV1 e PCV2 pertencem à família *Circoviridae* e ao género *Circovirus*, juntamente com outros circovírus animais (Figura 1.1), tais como o vírus da doença do bico e das penas (BFDV), o circovírus dos canários (CaCV), o circovírus dos patos (DuCV), o circovírus do tentilhão (FiCV), o circovírus dos gansos (CoGV), o circovírus da gaivota (GuCV), o circovírus do pombo (PiCV), o circovírus do estorninho (StCV) e o circovírus dos cisnes (SwCV) (Mankertz *et al.*, 2004; www.ictvonline.org).

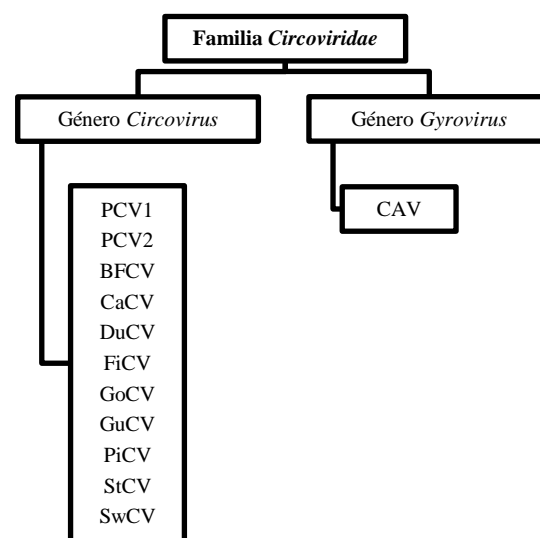


Figura 1.1: Família *Circoviridae*. Adaptado de www.ictvonline.org

O género *Gyrovirus* inclui o vírus da anemia das galinhas (CAV) (Mankertz *et al.*, 2004).

1.2.2. Propriedades físicas e biológicas

O PCV1 é estável a pH3, a temperatura de 56 °C a 70 °C durante 15 minutos e é resistente ao clorofórmio (Opriessnig *et al.*, 2007, Allan *et al.*, 2000; Segalés *et al.*, 2012).

O PCV2 é resistente a pH ácido e é bastante estável em condições ambientais, contudo a sua infeciosidade diminui após pasteurização durante 10 h a 60 °C e por calor seco durante 72 h a 80 °C ou 30 min a 120 °C (Opriessnig *et al.*, 2007, Segalés *et al.*, 2012). A infeciosidade do PCV2 também diminui com um pH 11-12 (Segalés *et al.*, 2012). A utilização de desinfetantes com base alcalina como é exemplo o hidróxido de sódio, e por agentes oxidantes, como o hipoclorito de sódio permitem a redução dos títulos virais de PCV2 (Royer *et al.*, 2001).

É expectável que as características descritas para o PCV1 e para o PCV2 sejam comuns entre eles, tendo em conta a morfologia semelhante.

1.2.3. Organização morfológica e molecular

Os circovírus (PCVs) têm a característica de possuir um genoma circular de DNA de cadeia simples (ssDNA) com cerca de 1,7 kb. São os mais pequenos vírus animais conhecidos e têm viriões sem invólucro e com simetria icosaédrica (Segalés *et al.*, 2012; Meng *et al.*, 2013).

É provável que o PCV1 e o PCV2 tenham a mesma origem evolutiva, embora ainda não tenha sido identificado um ancestral comum (Olvera *et al.*, 2007; Segalés *et al.*, 2012). São vírus semelhantes ao nível genómico contudo, apresentam diferentes patogenicidades, uma vez que o PCV1 não é patogénico (Olvera *et al.*, 2007; He *et al.*, 2013). O genoma do PCV1 é formado por 1759 nucleótidos (nt) enquanto o genoma do PCV2 contém mais 9 nt (Hamel *et al.*, 1998; Allan *et al.*, 2000; Olvera *et al.*, 2007; Henriques *et al.*, 2011; Cheung *et al.*, 2012; Segalés *et al.*, 2012). A identidade nucleotídica global dentro de isolados do PCV1 ou PCV2 é superior a 90 %, enquanto a identidade entre os isolados de PCV1 e PCV2 é de 68 a 76 % (Cheung *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006; He *et al.*, 2013).

O PCV tem uma organização ambisense do seu genoma, uma vez que no intermediário replicativo de cadeia dupla (RF), uns genes são transcritos pela cadeia positiva e outros pela cadeia complementar (negativa) (Segalés *et al.*, 2012; Meng *et al.*, 2013).

O genoma do PCV (Figura 1.2) é composto por onze grelhas de leitura aberta (ORFs), no entanto ainda só são conhecidas as funções das proteínas codificadas por 3 ORFs: ORF1, ORF2 e ORF3 (Hamel *et al.*, 1998; Henriques *et al.*, 2011).

A ORF1 está localizada na cadeia positiva, orientada no sentido horário e codifica proteínas essenciais para a replicação do vírus (Rep e Rep'), com 314 e 178 aminoácidos (aa) de comprimento, respetivamente (Faurez *et al.*, 2009; Segalés *et al.*, 2012; He *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2013).

A ORF2 está localizada na cadeia complementar, no sentido anti-horário e codifica a proteína estrutural da cápside (Cap) (Meng *et al.*, 2013), composta por 234 aa (Mankertz *et al.*, 2004; Segalés *et al.*, 2012).

Análises da ORF1 do PCV2 evidenciaram cerca de 83 % de identidade nucleotídica e 86 % de homologia proteica com o PCV1 e para a ORF2 67 % de identidade nucleotídica e 65 % de homologia proteica com PCV1 (Allan *et al.*, 2000).

A ORF3 está localizada na cadeia complementar, no sentido negativo da cadeia, sobrepondo-se à ORF1 e codifica uma proteína de 105 aa associada à indução de apoptose (Liu *et al.*, 2006; Henriques *et al.*, 2011; Cheung *et al.*, 2012; Segalés *et al.*, 2012). A região correspondente em estirpes de PCV1 mostrou ter somente uma identidade de 61,5 % com PCV2 (Liu *et al.*, 2006).

Numa região intergénica, entre as extremidades 5' dos genes Rep e Cap, está localizada a origem da replicação do vírus (Ori) (Mankertz *et al.*, 2004; Henriques *et al.*, 2011; Meng *et al.*, 2013).

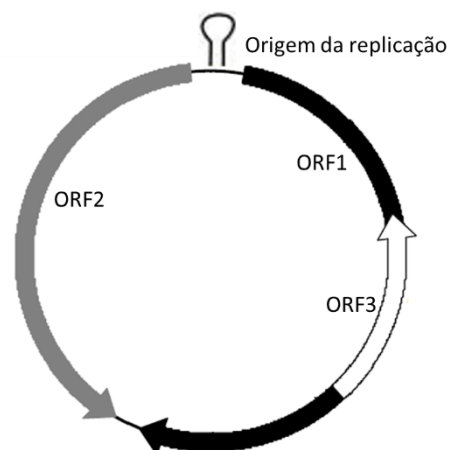


Figura 1.2: Representação esquemática do genoma do circovírus suíno. Adaptado de Faurez *et al.*, 2009

1.3. Replicação

A replicação do genoma (Figura 1.3) ocorre no núcleo das células infetadas e envolve a conversão de ssDNA (DNA de cadeia simples) para dsDNA (DNA de cadeia dupla), denominando-se de intermediário replicativo (RF).

No início da replicação e após a internalização, o virião é descapsidado e o genoma viral de cadeia simples (ssDNA) é transportado para o núcleo. O ssDNA serve como molde para a síntese de dsDNA. Na fase em que o genoma se encontra em cadeia dupla, ocorre a transcrição e a tradução dos mRNA transcritos, originando proteínas virais. O PCV provavelmente replica o seu genoma através de um mecanismo de círculo rolante (RCR), utilizado em plasmídeos bacterianos, fagos e plantas, bem como em outros vírus animais. A partir da forma intermediária replicativa, são produzidas moléculas de DNA de cadeia simples circulares, que podem ser convertidas para dsDNA e servirem como molde para a transcrição e replicação ou são encapsidadas por proteínas da cápside e os viriões são libertados, por lise celular (Cheung, 2003a; Faurez *et al.*, 2009; Cheung, 2012).

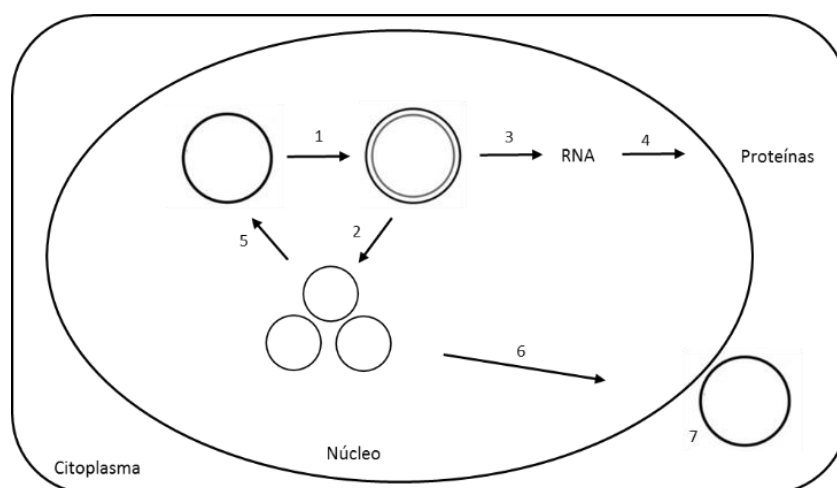


Figura 1.3: Ciclo de replicação do PCV. 1- conversão de ssDNA para dsDNA; 2- replicação pelo mecanismo de círculo rolante; 3- transcrição; 4- tradução; 5- ssDNA serve de molde para novo ciclo de replicação; 6- ssDNA é transportado para o citoplasma; 7- encapsidação. Adaptado de Zhai, 2004

1.4. Epidemiologia

Como já foi referido, o circovírus suíno foi descrito pela primeira vez por Tischer na década de 70. Estudos epidemiológicos mostram que a infeção por circovírus suíno é ubíqua em todo o mundo, sendo a prevalência de PCV1 maior do que a de PCV2 (Allan *et al.*, 2000; Segalés *et al.*, 2012). Muito provavelmente a infeção por PCV1 ocorre devido ao contacto próximo dos animais pois, Allan e seus colaboradores (2000) verificaram que após os anticorpos maternos desaparecem do soro dos animais, estes só voltavam a ser detetados depois da transferência dos animais para as unidades de engorda. Em Portugal, a infeção foi detetada no ano de 1999, numa exploração aparentemente indemne (Perestrelo, 2009).

O PCV2 parece permanecer nos suínos mesmo que estes tenham níveis elevados de anticorpos específicos contra o vírus. Rodriguez-Arrioja relata que detetou a presença de DNA viral até 22 semanas depois da inoculação do vírus (Allan *et al.*, 2000).

Os suínos são os únicos animais suscetíveis à infeção por circovírus suíno tipo 1 e tipo 2. A única exceção foi encontrada em ratos que conseguem replicar e transmitir o PCV2. Este facto leva a crer que são possivelmente hospedeiros do vírus (Ellis *et al.*, 2001; Kiupel *et al.*, 2001; Opriessnig *et al.*, 2009; Segalés *et al.*, 2012).

A prevalência dos anticorpos no soro anti-PCV2 ronda os 100 % nos animais em idade de abate (Allan *et al.*, 2000; Segalés *et al.*, 2012).

A transmissão do PCV2 pode ocorrer tanto vertical como horizontalmente (López-Soria *et al.*, 2008; Baekbo *et al.*, 2012) e praticamente todos os animais são infetados pelo vírus em alguma fase da sua vida (Segalés *et al.*, 2005; López-Soria *et al.*, 2008).

A principal via de transmissão do PCV2 é a via oro-nasal, contudo o vírus pode ser encontrado nas secreções respiratórias, bocais e oculares, fezes, saliva, urina, colostro e sémen (Segalés *et al.*, 2005).

Um estudo realizado em efetivos afetados por PMWS demonstrou a presença de carga viral de PCV2 tanto no soro, como em zaragatoas da cavidade nasal e retal, mostrando assim que são importantes vias de excreção do vírus (López-Soria *et al.*, 2008; Baekbo *et al.*, 2012). Este estudo sustenta a ideia que a principal via de transmissão é a oro-nasal, devido à elevada frequência de deteção viral (López-Soria *et al.*, 2008).

A transmissão vertical também é possível. Porcas gestantes infetadas com o vírus podem transmiti-lo à descendência e o vírus é detetado em leitões abortados, assim como no sémen de porcos infetados (López-Soria *et al.*, 2008).

1.5. Patogénese/ Sistema imunitário

O mecanismo de patogénese do PCV2 ainda não é totalmente conhecido. Contudo, pensa-se que a via natural para a infeção é muito provavelmente a oro-nasal. Os tecidos linfóides são os

alvos preferenciais deste vírus. A infecção e replicação nestes tecidos podem destruir a arquitetura dos folículos linfóides, levando à redução de linfócitos (Meng *et al.*, 2013).

A gravidade da redução linfóide está positivamente correlacionada com a concentração de PCV2 detetado nos tecidos linfóides (Segalés *et al.*, 2012; Meng *et al.*, 2013).

Apesar do tecido linfóide ser o alvo preferencial, estudos mostram ser possível a infecção e replicação do vírus em células de origem endotelial e mieloide (Steiner *et al.*, 2008; Segalés *et al.*, 2012). A replicação deste vírus já foi identificada em linfócitos T (CD4⁺e CD8⁺), linfócitos B e monócitos, assim como nos gânglios linfáticos brônquicos de porcos infetados. Contudo, um nível mais alto de replicação viral foi encontrado nas células B, sugerindo que estas são um alvo preferencial para a replicação do PCV2 (Meng *et al.*, 2013).

O PCV2 é internalizado através da atividade fagocitária ou endocitose em células dendríticas (CDs), contudo a sua permanência nestas células não provoca perda de infeciosidade viral ou morte celular. Desta forma e pelo facto destas células terem capacidade migratória, a disseminação do vírus é facilitada (Vincent *et al.*, 2003; Meng *et al.*, 2013).

Tanto a resposta imunitária celular como a humoral, com produção de anticorpos neutralizantes são importantes para a proteção contra a infecção por PCV2. Em condições experimentais, porcos infetados com PCV2 desenvolvem anticorpos neutralizantes específicos do PCV2 em 10-28 dias após a inoculação do vírus. Os títulos baixos destes anticorpos estão associados com o aumento da replicação do PCV2. (Madec *et al.*, 2008; Segalés *et al.*, 2012; Meng *et al.*, 2013).

No que diz respeito à prevenção vacinal, atualmente são várias as opções disponíveis no mercado, nomeadamente: PCV2 inativado, vírus quimérico de PCV1 inativado; vacinas de subunidades com base no produto da ORF2 expresso em baculovírus. Vários estudos têm sido realizados com o propósito de testar a eficácia das vacinas demonstrando que desde a sua introdução a taxa de mortalidade causada por este vírus tem diminuído (Meng *et al.*, 2013).

1.6. Técnicas de Diagnóstico

Para o diagnóstico de PCV2 podem ser utilizados três tipos de métodos consoante o alvo da deteção, podendo ser métodos que se baseiam na deteção de anticorpos no soro de suínos para PCV2, ou métodos que se baseiam na deteção de antigénio ou de DNA viral (Ellis *et al.*, 1998; Allan *et al.*, 2000; Pogranichnyy *et al.*, 2000; Opriessnig *et al.*, 2007).

1.6.1. Detecção de anticorpos no soro

Existem várias técnicas disponíveis para a detecção de anticorpos anti-PCV2, nomeadamente o ensaio de imunofluorescência indireta (IFA), a imunocitoquímica indireta, o ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática (ELISA) e o ensaio de anticorpos neutralizantes.

1.6.1.1. Imunofluorescência e imunocitoquímica indireta

O teste de imunofluorescência indireta e o teste de imunocitoquímica indireta baseiam-se na capacidade dos anticorpos presentes no soro de se ligarem a uma monocamada de células infetadas pelo vírus. Para ambos os ensaios o anticorpo utilizado, para detetar os anticorpos específicos presentes no soro, é um anticorpo anti-IgG de suíno (Allan *et al.*, 2000; Pogranichnyy *et al.*, 2000; Opriessnig *et al.*, 2007; Segalés *et al.*, 2012).

O que diferencia a imunofluorescência da imunoperoxidase é que na primeira os anticorpos são marcados com fluocromos que emitem a um determinado comprimento de onda, após excitação com um comprimento de onda específico (fluoresceína, p.e.) enquanto na segunda, os anticorpos são conjugados com uma enzima (p.e. peroxidase) (Ellis *et al.*, 1998; Pogranichnyy *et al.*, 2000; McNair *et al.*, 2004).

1.6.1.2. Soroneutralização

Este ensaio permite detetar a presença de anticorpos neutralizantes que têm a capacidade de impedir que o vírus infete as células. Neste ensaio, o soro em teste é incubado com o vírus e posteriormente é inoculado numa cultura de células. Após infeção, as células são monitorizadas quanto à presença de efeito citopático. A ausência de efeito citopático é devida à ligação dos anticorpos neutralizantes aos viriões, impedindo a infeção celular. Uma vez que o PCV2 não induz um efeito citopático visível nas células infetadas, este ensaio requer o uso de imunocitoquímica ou de imunofluorescência para determinar a presença ou ausência de replicação viral nas células inoculadas (Azinheira *et al.*, 1998; Pogranichnyy *et al.*, 2000; Meerts *et al.*, 2006; Opriessnig *et al.*, 2007).

1.6.1.3. Ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática

O teste ELISA é uma técnica imunoenzimática que fornece uma avaliação qualitativa e em alguns casos, quantitativa de anticorpos e caracteriza-se por ser rápida, sensível e económica (Murphy *et al.*, 2010; Leboffe *et al.*, 2011; Gan *et al.*, 2013).

São vários os autores que descrevem esta metodologia para a deteção de anticorpos específicos anti-PCV2 e atualmente são várias as opções disponíveis no mercado (Ellis *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 2000; Nawagitgul *et al.*, 2002; Gan *et al.*, 2013; Opriessnig *et al.*, 2004; Leboffe *et al.*, 2011).

Esta deteção pode ser efetuada por ELISA indireto, no qual as placas são revestidas com os antígenos contra os quais se quer detetar a presença de anticorpos. Ao adicionar o soro, se este contiver anticorpos específicos para o antígeno da placa, vai-se ligar formando uma ligação anticorpo-antígeno. A deteção desta ligação é feita pela incubação do conjugado (anticorpo anti-espécie conjugado com uma enzima). O substrato/cromogénio é adicionado a seguir e na presença da enzima é degradado com desenvolvimento de cor. A concentração de anticorpo primário presente no soro correlaciona-se diretamente com a intensidade da cor (Leboffe *et al.*, 2011; Gan *et al.*, 2013).

A deteção de ac anti-PCV2 também pode ser realizada através do ensaio ELISA de captura. A Ingenasa® dispõe de um kit que permite a comparação entre os valores de IgM e IgG com base na dinâmica destas duas imunoglobulinas quando do contacto com um antígeno. Neste método, as amostras são adicionadas em paralelo, a poços revestidos com anticorpos monoclonais anti-IgG e a poços revestidos com anticorpos monoclonais anti-IgM, permitindo a captura das IgM e das IgG presentes nos soros suspeitos. Após a adição de antígeno recombinante (VP2) de PCV2, este é capturado por IgM e/ou IgG se a amostra de soro contiver estas imunoglobulinas específicas para o PCV2. O conjugado, um anticorpo monoclonal específico de PCV2 conjugado com peroxidase, vai-se ligar posteriormente ao antígeno e esta ligação é revelada pela adição de substrato.

As IgM são imunoglobulinas produzidas por linfócitos B, quando do contacto primário com o agente infeccioso. Num contacto secundário com o antígeno específico, os anticorpos

predominantes consistem predominantemente em IgG, desempenhando funções importantes na resposta imunitária.

Assim, quando o título de IgM é superior ou idêntico ao título de IgG pode indicar a existência de infecção precoce (primeiros 21 dias após o contacto com o vírus); quando o título de IgM é menor que o título das IgG trata-se de uma infecção recente (entre 20 a 50 dias após inoculação). Quando existe um valor alto de IgG e valores negativos para IgM é porque é um caso de infecção tardia/ convalescença (2 meses após a infecção) (Opriessnig *et al.*, 2007).

Uma outra variante do ELISA descrito para a deteção de ac anti-PCV2 é o ELISA de bloqueio ou de competição. Um exemplo é o kit SERELISA® PCV2 Mono Ab Blocking, que permite detetar anticorpos específicos do PCV2 em soros e em fezes (Opriessnig *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2000). Neste método os poços estão revestidos com ac anti-PCV2. O complexo com antígeno e amostra em teste são adicionados aos poços que estão revestidos com o mesmo anticorpo. Quanto maior for a quantidade de anticorpos presentes na amostra, menor a quantidade de antígenos livres para se ligarem aos anticorpos revestidos na placa. Consequentemente, os anticorpos secundários conjugados com a enzima que são adicionados posteriormente, não são ligados, não havendo produção de cor. Assim, a ausência de cor é indicativo de resultado positivo (Murphy *et al.*, 2010; Gan *et al.*, 2013).

1.6.2. Deteção de antígeno viral

1.6.2.1. Isolamento do vírus

Para o isolamento viral, e como as células de rim de suíno PK-15 suportam a replicação do vírus *in vitro*, estas podem ser inoculadas com fluídos corporais de animais infetados pelo vírus. Contudo, e posteriormente para detetar a replicação viral é necessário recorrer-se à imunofluorescência ou à imunocitoquímica, o que faz com que o isolamento do PCV2 não seja um método utilizado rotineiramente em laboratório, uma vez que é demorado e pouco sensível (Allan *et al.*, 2000; Pogranichnyy *et al.*, 2000; Sorden *et al.*, 2000; Opriessnig *et al.*, 2007)

1.6.2.2. Imunohistoquímica e imunocitoquímica

Outros métodos são a imunohistoquímica e a imunocitoquímica, que englobam diferentes imuno-ensaios para localizar o antígeno de interesse, sendo no caso da imunohistoquímica são realizados em cortes histológicos anteriormente fixados com formol e embebidos em parafina, e na imunocitoquímica em esfregaços citológicos ou em células em monocamada (Ellis *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 1999; Opriessnig *et al.*, 2007; Ferro, A. B. 2014).

1.6.2.3. Microscopia eletrônica

A microscopia eletrônica permite visualizar partículas virais dentro da célula. Contudo não é um método utilizado rotineiramente no diagnóstico laboratorial por ser um método demorado, dispendioso e pouco sensível, sendo necessário a presença de um elevado número de partículas virais (pelo menos 10^5) para que seja possível a sua visualização (Opriessnig *et al.*, 2007).

1.6.2.4. Imunofluorescência direta

A Imunofluorescência também é utilizada como método direto, para a detecção de antígeno em tecidos, utilizando um anticorpo monoclonal ou policlonal (McNeilly *et al.*, 2002) (Opriessnig *et al.*, 2007).

1.6.2.5. ELISA de captura antigénica

Uma modalidade do método ELISA permite detetar antígenos em tecidos, estando disponível para tecidos e fezes (ex: SERELISA® PCV2 Ag Capture). Os resultados obtidos por este método são comparáveis aos detetados pelo método de IHC (Allan *et al.* 2000, Opriessnig *et al.*, 2007).

1.6.2.2. Detecção de ácido nucleico

1.6.2.2.1. Hibridação *in situ*

A Hibridação *in situ* permite localizar sequências específicas de DNA em tecidos e células, utilizando uma sonda de DNA marcada, que corresponde a uma região específica do genoma do PCV2. (Ellis *et al.*, 1998; Allan *et al.*, 1998; Pogranichnyy *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003; Opriessnig *et al.*, 2007).

1.6.2.2.2. Reação de cadeia pela polimerase

A PCR (reação em cadeia pela polimerase) está descrita por vários autores para detecção de ácido nucleico específico do PCV2 (Ellis *et al.*, 1998; Hamel *et al.*, 1998; Morozov *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2003)

A PCR permite amplificar sequências específicas de DNA, consistindo na amplificação enzimática *in vitro* catalisada por uma polimerase de DNA que tem a capacidade de sintetizar uma dupla cadeia de DNA a partir de dois oligonucleótidos iniciadores (*primers*). Geralmente é utilizada a Taq polimerase que por ser termoestável é resistente à desnaturação térmica.

A PCR consiste em três passos térmicos, repetidos durante um número variável de ciclos; no final de cada ciclo, o número de moléculas de DNA amplificadas duplica. O primeiro passo térmico permite a desnaturação das duas cadeias do DNA; o segundo assegura o emparelhamento (*annealing*) dos *primers*; o terceiro passo térmico assegura a extensão da sequência do DNA.

A fase de desnaturação ocorre a temperaturas elevadas, rondando os 92 °C a 95 °C, temperatura necessária para quebrar as pontes de hidrogénio e separar as cadeias do DNA. Para a fase de *annealing* dos *primers*, a temperatura tem que baixar, sendo frequentemente entre 50 °C a 60 °C. A fase de extensão é realizada à temperatura ótima de atividade da polimerase de DNA, normalmente 72 °C (Tenreiro *et al.*, 2014).

Para além da PCR convencional existem várias variantes utilizadas para a detecção de ácido nucleico do PCV2. A multiplex-PCR permite detetar mais do que uma sequência alvo

(Pogranichnyy *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003; Yue *et al.*, 2009). A *nested*-PCR na qual são usados dois pares de *primers*: o fragmento resultante da primeira fase de amplificação é utilizado como DNA molde na segunda fase de amplificação (Kiatipattanasakul *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004). A *multiplex nested*-PCR combina a *multiplex*-PCR e a *nested*-PCR permitindo detetar quantidades muito reduzidas de várias sequências alvo. Este método foi utilizado em amostras de sêmen e em tecidos incluídos em parafina, permitindo identificar e diferenciar o PCV1 do PCV2 (Kim *et al.*, 2003).

A PCR em tempo real (qPCR) permite quantificar o número de cópias do genoma do PCV2 existente no soro ou em tecidos (Opriessnig *et al.*, 2003; Olvera *et al.*, 2004; Segalés *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2013). Para a deteção da amplificação existem várias estratégias possíveis podendo-se recorrer à utilização de corantes (ex: SYBR® Green) que emitem fluorescência quando se intercalam no DNA de cadeia dupla ou, recorrendo-se à utilização de sondas de hidrólise específicas (ex: Taqman®). Estas sondas contêm um fluorocromo ligado à extremidade 5' (*repórter*) e um inibidor de fluorescência ligado à extremidade 3' (*quencher*) (Figura 1.4). Na fase de amplificação, se existir na amostra a sequência-alvo, esta sonda liga-se entre os locais onde os dois *primers* emparelham. Durante a fase de extensão, enquanto a DNA polimerase está a sintetizar uma nova molécula, e devido à atividade exonuclease 5'-3' da enzima, a sonda é clivada da cadeia de DNA, permitindo que a extensão continue. A hidrólise da sonda leva a um afastamento do *repórter* em relação ao *quencher*, resultando num aumento exponencial da intensidade de fluorescência (Heid *et al.*, 1996; Arya *et al.*, 2005; Tenreiro *et al.*, 2014).

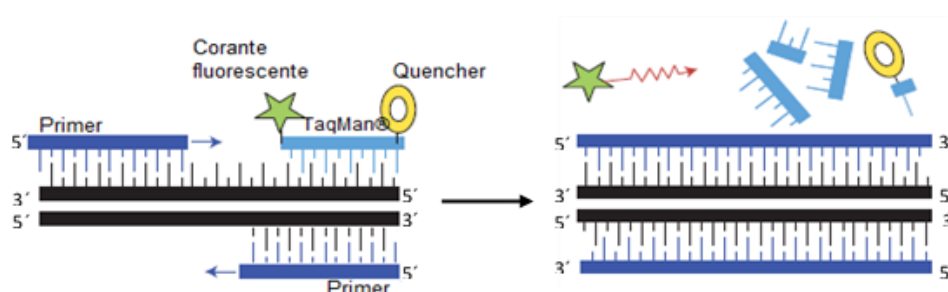


Figura 1.4: Mecanismo de funcionamento da sonda Taqman®. Adaptado de Arya *et al.*, 2005

À medida que o sinal fluorescente vai sendo detetado, o software de análise dos dados vai construindo um gráfico de amplificação. Denomina-se *baseline* à fluorescência basal correspondente à mistura de PCR, em que o sinal fluorescente não é considerado específico. A linha *threshold* corresponde ao valor a partir do qual o aumento da fluorescência é considerado significativo em relação ao *baseline*. Por sua vez, o ciclo no qual o sinal fluorescente intercepta a fluorescência basal da mistura de reação, é denominado por *cycle threshold* (Ct). Quanto maior o número de moléculas presentes inicialmente, menor o número de ciclos necessários para que ocorra um aumento exponencial da fluorescência. Desta forma valores baixos de Ct correspondem a amostras com maior concentração de DNA alvo, enquanto que valores altos de Ct, correspondem a menor concentração de DNA alvo presente na amostra teste (Heid *et al.*, 1996; Giulietti *et al.*, 2001; Tenreiro *et al.*, 2014).

A quantificação do DNA alvo por PCR em tempo real pode ser realizada de forma relativa ou absoluta. Na quantificação relativa, os valores Ct das amostras são comparados com um controlo. Na quantificação absoluta determina-se o número exato de cópias iniciais do fragmento de interesse recorrendo-se a uma curva padrão que é construída a partir de diluições seriadas de uma amostra padrão de concentração conhecida. Os valores de Ct são representados em função do logaritmo da quantidade inicial de DNA alvo e depois relacionados com o sinal fluorescente de cada amostra (Heid *et al.*, 1996; Giulietti *et al.*, 2001; Tenreiro *et al.*, 2014).

1.7. Objetivo do estudo

A presente dissertação teve como objetivo o estudo da infeção por PCV2 em animais não vacinados, através da análise de anticorpos específicos IgM e IgG presentes no soro e pela análise da carga viral de DNA PCV2 presente nas amostras. Para isto, a pesquisa de anticorpos específicos foi detetada através da utilização de um ensaio ELISA, que permitiu a distinção entre IgM e IgG, e a carga viral determinada através de real time PCR quantitativo. Com isto, pretendeu-se verificar se existia alguma relação entre os anticorpos presentes e a quantificação de DNA viral.

2.Trabalho experimental – Detecção de PCV2 em soros de suínos

2.1. Materiais e métodos

2.1.1. Amostras

Neste estudo foram utilizadas 105 amostras de soro provenientes de suínos não vacinados contra o PCV2, de três explorações. Incluíram-se animais com idades superiores a 20 semanas, para garantir a ausência de anticorpos maternos contra o vírus.

As amostras foram devidamente identificadas durante a recolha, mantidas a uma temperatura de 4 °C, para impedir a degradação dos ácidos nucleicos e enviadas para o laboratório.

À chegada ao laboratório cada amostra foi centrifugada durante 15 minutos a uma velocidade de 8500 g à temperatura ambiente, para separar o soro do coágulo tendo sido depois separada em duas alíquotas, de acordo com as finalidades pretendidas: uma alíquota para posterior análise por ELISA e outra para extração de ácido nucleico viral.

Inicialmente as amostras foram testadas quanto à presença de ac anti-PCV2, através da utilização de um *kit* comercial ELISA. Posteriormente, amostras selecionadas foram testadas para a presença do genoma viral, através de qPCR. A análise por qPCR ocorreu sempre que possível de imediato; as amostras foram posteriormente mantidas congeladas a -20 °C.

2.1.2. Método ELISA PCV2

Para o método ELISA foi utilizado um *kit* comercial da marca Ingenasa de acordo com as recomendações do fabricante (Ingenasa). Trata-se de um ensaio imunoenzimático de captura, baseado no uso de 3 anticorpos monoclonais (Mab específico de PCV tipo 2, Mab específico de IgM suínos e Mab específico de IgG suínos) e um antígeno recombinante. O *kit* é constituído por 2 placas, uma com os poços revestidos com Mab anti IgG e outra com Mab anti IgM (Figura 2.1).

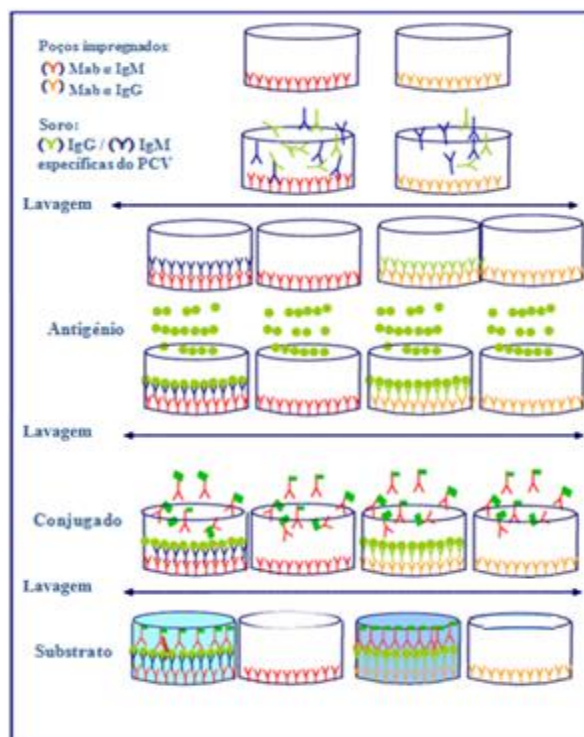


Figura 2.1: Esquematização do método utilizado (Adaptada da ficha técnica do método, acedida em: www.ingenasa.es)

Quando as amostras são adicionadas às placas, as IgM e IgG presentes são capturadas por Mabs que estão na placa. Depois da lavagem para retirar o material não fixado a partir da amostra de soro, e com o objetivo de se avaliar se as IgM e IgG presentes nas amostras são específicas do PCV2, adiciona-se antígeno recombinante que é capturado por IgM e/ou IgG, se a amostra de soro contiver imunoglobulina M ou G específica para PCV2. Após nova lavagem, adiciona-se o conjugado (Mab específico da proteína VP2) marcado com peroxidase, que se vai ligar ao antígeno fixado pelos anticorpos IgM e IgG. Depois da incubação e de nova lavagem para retirar o material não específico, adiciona-se o substrato. Os poços onde foram testados soros com IgG e/ ou IgM específicos vão apresentar coloração.

Este ensaio permite determinar o tipo de infecção por PCV2, através da comparação entre DO de IgG e de IgM (Tabela 2.1).

Tabela 2.1: Relação entre a densidade ótica de 450 nm de IgM e de IgG com o tipo de infeção correspondente

Ig	Relação IgM e IgG	Tipo de infeção
IgM	IgM > IgG	Infeção ativa recente
	IgM < IgG	Infeção recente
IgG	IgG+	Infeção tardia
	IgG-	Sem contacto

Para a realização do ensaio foram usados controlos negativos e positivos em duplicados para IgG e IgM. A validação do ensaio foi realizada de acordo com as indicações contidas na bula do kit e encontram-se esquematizadas na tabela abaixo (Tabela 2.2). As amostras foram classificadas como tratando-se de infeção ativa, recente, tardia ou sem infeção, com base nos valores de *cut off* obtidos.

Tabela 2.2: Critérios de validação do ensaio ELISA

	DO controlos positivos	DO controlos negativos
IgG e IgM	> 0,7	< 0,3

3.1.3. Método qPCR

3.1.3.1. Extração e purificação do DNA

O DNA viral foi extraído a partir de 200 µL de soro, utilizando o *kit* comercial Thermo Scientific GeneJET DNA Purification Mini Kit, de acordo com as instruções do fabricante. O DNA isolado foi armazenado a -20 °C para posterior amplificação.

O primeiro passo para a extração do DNA viral das amostras é a lise das proteínas da cápside viral, que no caso deste kit é realizada inicialmente com proteinase K, que vai hidrolizar as proteínas na presença de tampão lise. Ao lisado é adicionado etanol para promover a precipitação dos ácidos nucleicos, sendo depois dispensado na coluna de purificação, para fixação do DNA presente nas amostras à membrana. Os passos seguintes, com a adição de

tampão de lavagem servem para eliminar os contaminantes celulares contidos na amostra e retidos na membrana de sílica da coluna de purificação. O DNA presente na membrana já purificado é depois eluído com tampão eluição, em condições de baixa força iónica.

De forma a validar a extração de DNA e posterior amplificação por qPCR, foi usado água estéril como controlo negativo de extração e um controlo positivo exógeno (IPC) que foi adicionado a cada amostra na etapa de lise. Este controlo é constituído por uma sequência de DNA sintético e funciona como um controlo de qualidade interno pois permite confirmar se o kit tem capacidade para amplificar a sequência alvo extraída das amostras e se existe nas amostras algum inibidor que possa impedir a amplificação do DNA presente, evitando assim falsos negativos.

2.1.3.2. Amplificação do DNA viral por qPCR

Para a amplificação do DNA viral foi utilizado um *kit duplex* pois permite detetar dois alvos consoante a marcação da sonda (Tabela 2.3), permitindo detetar e quantificar a presença de DNA PCV2 usando uma sonda marcada com fluoróforo FAM tendo como gene alvo a Orf1 (gene que codifica para a proteína replicase); a utilização de uma sonda marcada com o fluoróforo VIC, para amplificação do IPC, permite validar a extração do DNA.

Tabela 2.3: Alvos utilizados no sistema de quantificação de DNA

Alvo	Alvo	Fluoróforo
PCV2	Orf 1	FAM
IPC	DNA sintético	VIC

O *kit* contém uma *mix* pronta a usar, composta por:

- Um sistema de deteção alvo para PCV2: *Primers reverse e forward* e uma sonda TaqMan® marcada com FAM™ - NFQ (não fluorescente quencher);
- Um sistema de deteção alvo para IPC: *primers reverse e forward* e uma sonda TaqMan®, marcada com VIC® – TAMRA™;

- Tampão de reação e Taq polimerase.

A mistura da reação utilizada foi preparada consoante as recomendações do fabricante, no volume final de 20 μ L da mix para 5 μ L das amostras e dos controlos.

A amplificação do DNA viral foi realizada com um termociclador BIORAD modelo CFX96™, utilizando um *kit* comercial da marca Life Technologies™ e o programa de amplificação utilizado encontra-se esquematizado na Tabela 2.4.

Tabela 2.4: Programa de amplificação

	Número de ciclos	Temperatura	Duração
Passo 1	1x	50 °C	2 min
Passo 2	1x	95 °C	10 min
Passo 3	45x	95 °C	15 s
		60 °C	1 min

Para a quantificação do DNA alvo foram realizadas diluições seriadas de base 10 (Tabela 2.5) a partir de uma amostra com concentração de DNA PCV2 conhecida. Os valores de Ct de cada diluição, foram utilizados, pelo *software* do termociclador, para o cálculo da curva padrão.

Tabela 2.5: Diluições seriadas de DNA controlo para composição da curva padrão

Tubo	Diluição	Concentração final
1	Não diluído	1,00E+10
2	1,00E-01	1,00E+09
3	1,00E-02	1,00E+08
4	1,00E-03	1,00E+07
5	1,00E-04	1,00E+06
6	1,00E-05	1,00E+05
7	1,00E-06	1,00E+04
8	1,00E-07	1,00E+03

Com a análise da curva padrão e com o valor do declive da reta é possível calcular a eficiência da amplificação (EA). Uma eficiência de 100 % corresponde a uma inclinação de -3,32, o que indica que o número de moléculas amplificadas duplica a cada ciclo de PCR (Kubista *et al.*, 2006; Tenreiro *et al.*, 2014).

A amplificação e quantificação foram validadas de acordo com as recomendações do fabricante e encontram-se esquematizadas na tabela abaixo (Tabela 2.6).

Tabela 2.6: Critérios de validação do ensaio qPCR

Amostras	Critérios
Controlo negativo	DNA PCV2 não detetado
Controlo positivo	DNA PCV2 detetado
Amostras em teste (relativamente ao controlo interno exógeno)	± 3 Ct do obtido pelo NCS na análise da sonda marca com o fluoróforo VIC

3. Resultados

3.1. ELISA

Inicialmente as amostras foram testadas quanto à presença de ac anti-PCV2, com um *kit* ELISA comercial. Foram analisadas um total de 105 amostras, distribuídas por 3 ensaios de ELISA, correspondendo cada um a uma exploração.

Para os três ensaios foram calculados os *cut off* para definir o valor de densidade ótica (DO) a partir do qual as amostras foram consideradas negativas e positivas (Tabela 3.1). Para o cálculo do *cut off* IgM a DO 450 nm do controlo positivo é multiplicado por 0,4 e para o cálculo do *cut off* IgG a DO 450 nm do controlo positivo é multiplicada por 0,3.

Tabela 3.1: Valores de *cut off* obtidos em cada ensaio ELISA. Exploração A- IgM 1,057, IgG 0,901; Exploração B- IgM 0,904, IgG 0,712; Exploração C- IgM 0,795, IgG 0,597

Médias dos controlos		Exploração A	Exploração B	Exploração C
IgM	Ctr -	0,234	0,185	0,261
	Ctr +	2,641	2,259	1,989
IgG	Ctr -	0,148	0,117	0,185
	Ctr +	3,005	2,372	1,991
Cut off	IgM	1,057	0,904	0,795
	IgG	0,901	0,712	0,597

A exploração A (n= 40) apresentou 19 animais com infeção tardia, 12 animais sem infeção, oito animais com infeção recente e apenas um animal com infeção ativa. A exploração B (n= 33) apresentou 20 animais com infeção tardia, 11 animais com infeção recente e dois animais sem infeção. Nesta exploração não foram detetados animais com infeção ativa. A exploração C (n= 32) apresentou 21 animais com infeção tardia, nove animais com infeção recente, um animal com infeção ativa e um animal sem infeção (Figura 3.1 e Tabela 3.2).

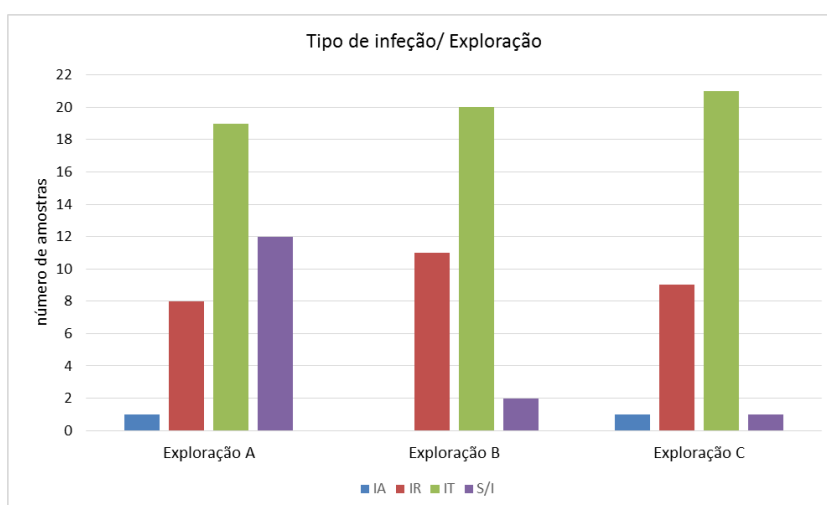


Figura 3.1: Tipo de infecção por exploração. Azul- infecção ativa, vermelho- infecção recente, verde- infecção tardia e roxo- sem infecção

Tabela 3.2: Número de amostras testadas por ELISA por exploração e tipo de infecção por exploração

	Infeção ativa	Infeção recente	Infeção tardia	Sem infecção
Exploração A	1/ 40	8/ 40	19/ 40	12/ 40
Exploração B	0/ 33	11/ 33	20/ 33	2/ 33
Exploração C	1/ 32	9/ 32	21/ 32	1/ 32

De forma global, a maioria das amostras processadas foram provenientes de animais com a presença de ac anti-PCV2 ($n= 90$) e apenas uma pequena quantidade não apresentaram a presença de ac anti-PCV2 ($n= 15$) (Figura 3.2A). Das amostras que apresentaram infecção por PCV2, a maioria foram provenientes de animais com infecção tardias ($n= 60$), de animais com infecção recentes ($n= 28$) e infecção ativa ($n= 2$) (Figura 3.2B).

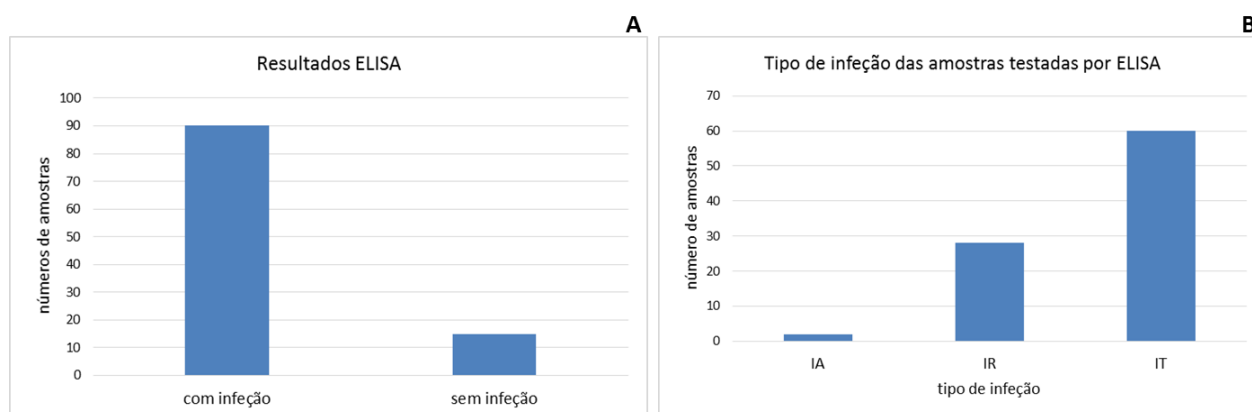


Figura 3.2: A- Resultados ELISA: 90 animais apresentaram infecção e 15 não apresentaram infecção. B- 2 animais apresentaram infecção ativa, 28 animais infecção recente e 60 animais infecção tardia

3.2. qPCR

Foram selecionadas algumas amostras para serem testadas no que respeita à presença de DNA viral consoante o seguinte critério: das amostras que tinham sido classificadas como sendo de animais com infecção ativa e animais com infecção recente foram analisadas 85 a 100 % das amostras totais; das amostras provenientes de animais com infecção recente e com infecção tardia, foram avaliadas 35 a 50 % das amostras totais. Contudo e devido aos resultados obtidos foram incluídas 80 % das amostras de animais sem infecção. Assim sendo, para análise por qPCR foram incluídas duas amostras com infecção ativa, 24 com infecção recente, 21 com infecção tardia e 12 amostras sem infecção, totalizando 59 amostras (Tabela 3.3).

Tabela 3.3: Critério de escolha de amostras analisadas por qPCR

	Total de amostras existentes	Critério de escolha (%)	Número de amostras testadas por qPCR
Infeção ativa	2	85 – 100	2
Infeção recente	28		24
Infeção tardia	60	35 – 50	21
Sem infecção (critério inicial)	15	35 – 50	7
Sem infecção (critério utilizado)	15	80	12

O total de 59 amostras foram analisadas em quatro corridas de qPCR.

Para cada corrida de qPCR e para a quantificação das amostras em teste foram utilizadas sete diluições seriadas de base 10 a partir de uma amostra com concentração de DNA PCV2 de $1,0E+10$. As quatro curvas de calibração e as equações lineares foram automaticamente geradas e o valor do declive da reta obtido foi usado para determinar a eficiência da amplificação através da equação: $E = 10^{(-1/\text{declive})} - 1$ (Figura 3.3).

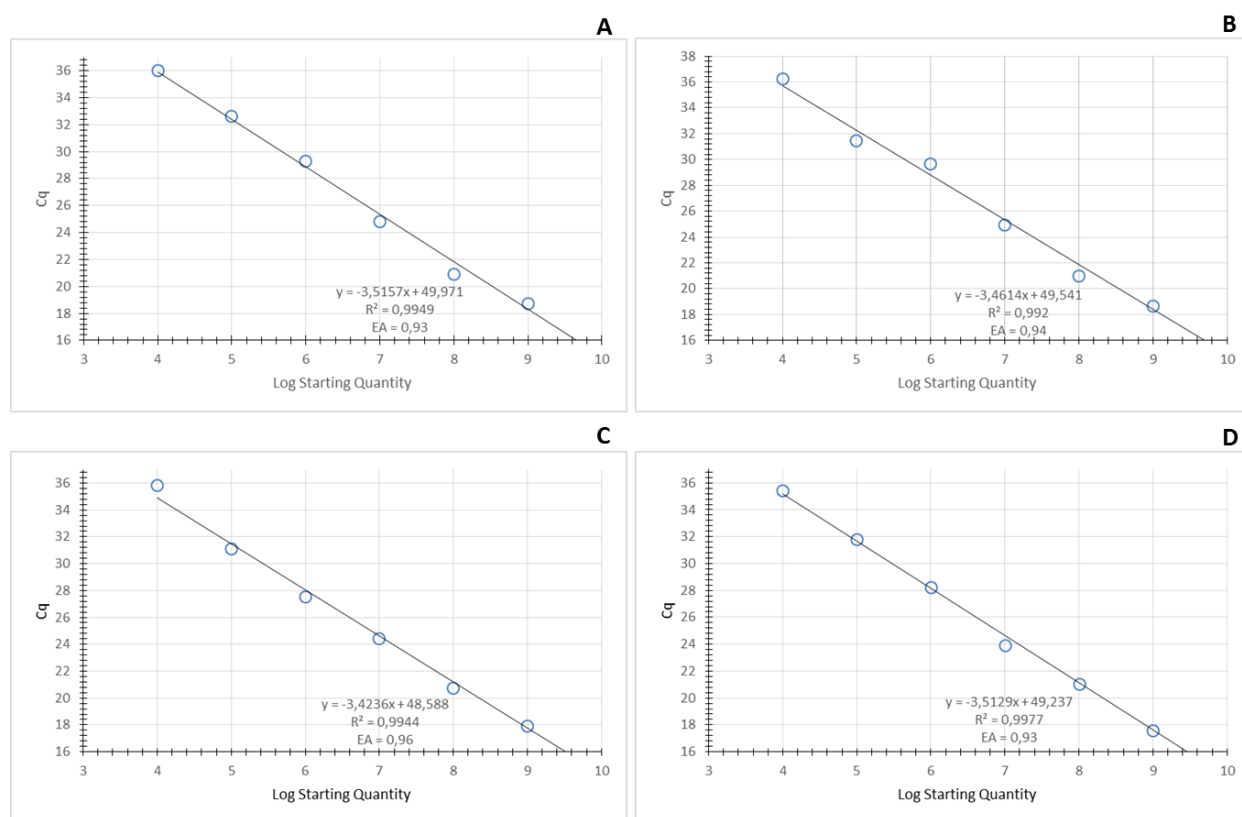


Figura 3.3: Curvas de calibração obtidas através de 7 diluições seriadas do DNA padrão. A- EA= 0.93; B- EA= 0.94; C- EA= 0.96; D-EA= 0.93.

As eficiências das amplificações foram similares variando entre 93 e 96 %, com um valor médio de eficiência de 94 %.

Para validação do controlo interno, os valores Cts obtidos pela análise da sonda marcada com o fluoróforo VIC, nos quatro ensaios qPCR foram avaliados. No primeiro ensaio o NCS obteve um Ct de 28,12 e as amostras testadas apresentaram Cts entre 25,55 e 29,50. No segundo ensaio

o NCS obteve Ct 28,29 e as amostras Cts entre 26,26 e 29,94. No terceiro ensaio o NCS obteve Ct 28,09 e os Cts das amostras foram entre 26,90 e 30,40. No último ensaio o Ct do NCS foi 27,83 e os Cts das amostras foram entre 25,85 e 28,33 (Tabela 3.4).

Tabela 3.4: Valores Ct obtidos pela sonda marcada com VIC, no qPCR. Ensaio 1- 28,12; ensaio 2- 28,29; ensaio 3- 28,09; ensaio 4- 27,83

Ensaio	Valor Ct VIC- NCS	Valores Ct das amostras	Critério para validação
Ensaio 1	28,12	25,55 < Ct > 29,50	25,12 < Ct > 31,12
Ensaio 2	28,29	26,26 < Ct > 29,94	25,29 < Ct > 31,29
Ensaio 3	28,09	26,90 < Ct > 30,40	25,09 < Ct > 31,09
Ensaio 4	27,83	25,85 < Ct > 28,33	24,83 < Ct > 30,83

As amostras classificadas pelo método ELISA como sendo de animais com infecção ativa (n= 2), com valores de IgM>IgG, apresentaram por qPCR, valores semelhantes, com uma média de 5,95E+06 cópias por mL de soro.

As amostras com infecção recente para o PCV2, com o título de IgG> IgM, testadas por qPCR (n= 24) apresentaram resultados variáveis de carga viral. Maioritariamente (n= 11) estas amostras apresentaram uma quantificação viral de 1,0E+06 cópias por mL de soro; quatro amostras apresentaram quantificação de 1,0E+05 cópias por mL de soro e outras quatro apresentaram 1,0E+04 cópias por mL de soro. Das restantes cinco amostras, três apresentaram 1,0E+07 cópias por mL de soro, uma amostra 1,0E+03 cópias por mL e uma amostra não revelou a presença de DNA viral (Figura 3.4A). O valor médio de quantificação foi de 1,98E+06.

Das amostras com infecções tardias ao PCV2 através do ELISA, quando testadas por qPCR (n= 21) apresentaram resultados variáveis. Maioritariamente as amostras (n= 7) apresentaram uma quantificação viral de 1,0E+06 cópias por mL de soro e cinco apresentaram quantificação de 1,0E+05. Das restantes nove, quatro amostras apresentaram 1,0E+04 cópias por mL de soro, uma apresentou uma carga viral de 1,0E+07 cópias e quatro foram negativas a DNA viral

(Figura 3.4B). A média de quantificação destas amostras positivas foi de $4,15\text{E}+05$ cópias por mL de soro.

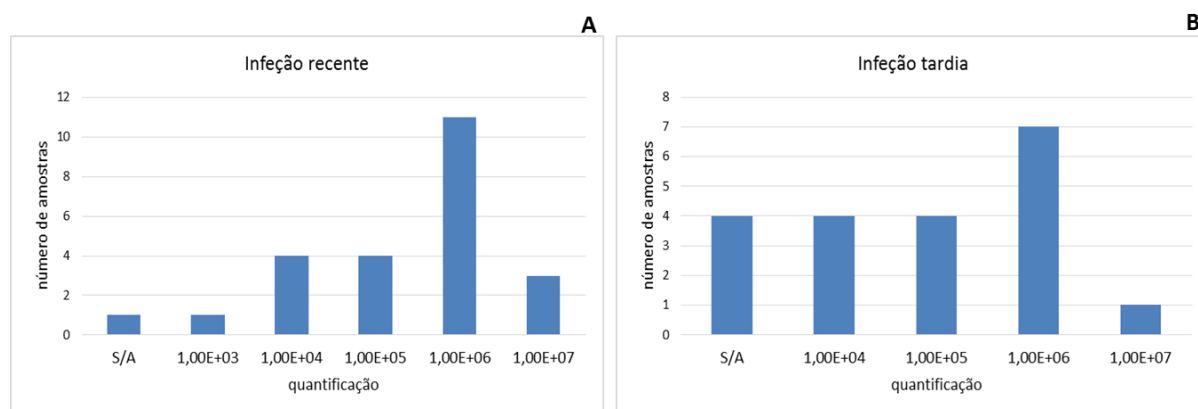


Figura 3.4: A- Quantificação obtida por qPCR das amostras classificadas como infeção recente por ELISA: uma amostra sem amplificação, uma amostra com $1,0\text{E}+03$ cópias por mL, quatro amostras com $1,0\text{E}+04$, quatro amostras com $1,0\text{E}+05$, 11 amostras com $1,0\text{E}+06$ e três amostras com $1,0\text{E}+07$. B- Quantificação obtida por qPCR das amostras classificadas como infeção tardia por ELISA: quatro amostras sem amplificação, quatro amostras com $1,0\text{E}+04$ cópias por mL, cinco amostras com $1,0\text{E}+05$, sete amostras com $1,0\text{E}+06$ e uma amostra $1,0\text{E}+07$.

As amostras classificadas como sendo de animais negativos para a presença de ac anti-PCV2 ($n=12$), quando testadas por qPCR a maioria foi negativa ($n=11$), embora numa se tenha obtido uma quantificação de $1,0\text{E}+06$ cópias por mL de soro.

No total das 59 amostras testadas, 43 foram positivas. Apenas 16 amostras foram dadas como negativas à presença de DNA viral. Estas amostras foram classificadas pelo método ELISA como sendo referentes a infeção recente ($n=1$), infeção tardia ($n=4$) e amostras que não apresentaram ac anti-PCV2 ($n=11$).

3.1. Discussão dos resultados

Numa primeira abordagem, os resultados da avaliação serológica das amostras quanto à presença de anticorpos específicos IgG e IgM para PCV2 e à relação existente entre eles, nas três explorações, está de acordo com o que tem sido descrito na bibliografia, confirmando que a maior parte dos animais (90 em 105) apresentam anticorpos específicos contra o PCV2 (Allan *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 2000; Larochelle *et al.*, 2003; McIntosh *et al.*, 2006). Os animais escolhidos para este estudo apresentavam idades superiores a 20 semanas, idade a partir da qual vários autores afirmam já não existirem anticorpos maternos, apesar do intervalo de tempo da sua permanência ser amplo e variável (Opriessnig *et al.*, 2004; McKeown *et al.*, 2005; Opriessnig *et al.*, 2008; Engle *et al.*, 2014). Garantiu-se desta forma que os anticorpos detetados são resultantes do contacto com o vírus e não da imunidade passiva.

Nesta análise apenas 15 animais, dos 105 estudados, foram seronegativos, não tendo sido detetados nem IgG nem IgM específicos para PCV2 no soro. Este facto pode ser devido a: i) estes animais não tiveram contacto com o vírus em nenhuma fase da vida até à recolha do sangue ou ii) esse contacto foi recente, não tendo ocorrido tempo suficiente para a ativação da imunidade humoral que resultaria na produção de anticorpos específicos (Abbas *et al.*, 2007; Murray *et al.*, 2010). Embora o tempo de resposta não seja linear, Larochelle (2000) sugere que os ac anti-PCV2 começam a ser detetados no soro, 11 a 18 dias após o contacto com o vírus. Neste caso não é possível garantir que os animais estudados não contactaram com o vírus, pois para isso, seria necessário repetir a análise mais tarde e verificar se apresentavam anticorpos específicos e assim confirmar qual das hipóteses seria a mais adequada em cada caso.

Dos 105 animais estudados, 90 apresentaram ac anti- PCV2 e foram classificados quanto ao tipo de infeção. Uma infeção ativa/ precoce corresponde a um contacto com o vírus no máximo há 21 dias (Opriessnig *et al.*, 2007). Nesta fase da infeção é esperado que os valores de IgM sejam superiores aos de IgG. À medida que os níveis de IgM específicas começam a aumentar no sangue, as células Th são ativadas e produzem citocinas que vão sinalizar as células B a trocar a classe da cadeia pesada da imunoglobulina, de IgM para IgG. As IgM têm uma semivida até 50 dias após o contacto com vírus (Christopher L., *et al.*, 2012). Quando os níveis de IgG superam os de IgM, inicia-se uma fase mais tardia da infeção. O tempo de permanência das IgG pode ser variável mas podem permanecer cerca de 90 dias após a infeção (Larochelle *et al.*, 2000). Assim, os resultados obtidos apontam para que apenas dois animais estivessem numa

fase ativa/ precoce da infeção (IgM > IgG), 28 estivessem numa fase recente da infeção (IgG > IgM) e que a maioria dos animais (60 em 105) estivessem numa fase tardia da infeção (valor negativo de IgM). Este resultado indica-nos que estes animais já contactaram pelo menos uma vez com o vírus, altura em que terão sido produzidas IgM específicas. Contudo, este contacto já foi há tempo suficiente para as IgM não serem detetadas no soro (Abbas *et al.*, 2007; Murray *et al.*, 2010; Christopher L., *et al.*, 2012).

De forma a correlacionar a classificação serológica com a carga viral, 59 das 105 amostras testadas quanto à presença de ac anti-PCV2 foram avaliadas por qPCR, tendo sido seleccionadas a totalidade das amostras classificadas como infeção ativa/ precoce (n= 2), 24 amostras de infeção recente, 21 amostras de infeção tardia e 12 de animais sem anticorpos específicos para PCV2.

As eficiências das reações de amplificação foram consideradas satisfatórias, tendo variado entre 93 e 96 % confirmando a especificidade do sistema de amplificação. Obter-se uma amplificação 100 % eficiente, ou seja, a cada ciclo o número de cópias duplicar, é difícil de se conseguir devido à existência de vários fatores que podem interferir na reação de amplificação, tais como a qualidade dos *primers*, a pureza do DNA alvo, entre outros. Eficiências inferiores a 90 % são considerados não satisfatórias, podendo indiciar contaminação da Taq polimerase ou o uso de temperaturas de emparelhamento não adequadas. Por outro lado, eficiências superiores a 100 % normalmente resultam da presença de produtos de amplificação não específicos (Tenreiro *et al.*, 2014).

A utilização do controlo interno exógeno (IPC) permitiu validar a extração de DNA e a amplificação pela análise dos valores de Ct através dos resultados obtidos com a sonda marcada com o fluoróforo VIC, validando ambos os processos.

Do grupo de amostras testadas por qPCR (n= 59), apenas 16 não obtiveram quantificação viral, sendo que as restantes (n= 43) apresentaram DNA de PCV2 no soro.

Das amostras que não obtiveram quantificação viral (n= 16), são maioritariamente amostras de animais seronegativos (n= 11), quatro pertenciam a animais com infeção tardia (IgG elevados e IgM negativos) e uma amostra classificada como infeção recente (IgG> IgM), embora no limiar de ser considerada negativa para IgM. No caso das amostras positivas para anticorpos, estes resultados explicam-se uma vez que os níveis de IgG permanecem elevados mesmo que o vírus já não esteja presente (Larochelle *et al.*, 2000; Abbas *et al.*, 2007; Christopher L., *et al.*, 2012).

Nas restantes amostras (n= 43), a carga viral detetada variou entre 6,97E+03 a 8,97E+07, com um valor médio de 4,39E+06, não tendo sido detetadas diferenças significativas nos valores de quantificação entre as amostras classificadas como correspondendo a infeção ativa, recente ou tardia. Estes resultados vão de encontro aos obtidos em estudos anteriores, onde se mostrou, que a maioria dos animais apresentam DNA de PCV2, sendo que a carga viral encontrada varia entre 1,8E+09 a 1E+04 cópias por mL de soro, com uma média de 1,89E+05 (Liu *et al.*, 2000).

Deste grupo de amostras, faz parte uma amostra negativa para a presença de ac anti-PCV2. Esta amostra obteve uma quantificação viral de 1,95E+06. Das 15 amostras que não apresentaram ac anti-PCV2, 12 foram analisadas por qPCR e apenas uma amostra apresentou este resultado contraditório. Este resultado contraditório pode ser devido a uma infeção muito recente, não tendo ocorrido tempo suficiente para a produção de anticorpos sinalizadores da infeção.

Analisando os resultados obtidos pelo método ELISA e pelo método qPCR verifica-se que a maioria (43 em 59) dos animais que apresentaram anticorpos no soro também foram positivos para a presença de DNA viral. A presença de DNA viral juntamente com a presença de anticorpos já tinha sido relatada em estudos anteriores (McIntosh *et al.*, 2006).

No presente estudo, os anticorpos medidos pelo método ELISA parecem não ser eficazes na diminuição da carga viral. Uma explicação para este resultado poderá ser que este método ELISA não detete apenas anticorpos neutralizantes. Para confirmar se se verifica uma diminuição da carga viral na presença de altos níveis de anticorpos, será necessário avaliar o título de anticorpos neutralizantes, através de um ensaio de soroneutralização. No entanto sendo o circovírus um vírus que não exibe efeito citopático, a detecção da eficiência de infecção na presença de anticorpos neutralizantes, teria que ser efetuada, através de imunocitoquímica ou imunofluorescência.

4. Conclusão

O vírus PCV2 está associado a uma síndrome de emagrecimento pós-desmame que causa elevados prejuízos nas explorações afetadas, estando associado a uma elevada mortalidade, sendo por isso de extrema importância o seu controlo. A presente dissertação teve como objetivo a análise dos anticorpos específicos IgG e IgM presentes no soro bem como a carga viral, em animais não vacinados.

Os resultados obtidos pela análise de anticorpos específicos e pela análise do DNA viral mostraram que a maioria dos animais são positivos para o vírus, não tendo sido identificada nenhuma relação entre a fase da infeção de acordo com a classificação pelo método ELISA, com a carga viral detetada por qPCR.

Analisando os resultados obtidos por ambos os métodos verificou-se que animais que apresentaram anticorpos específicos no soro também foram positivos para a presença de DNA viral, sugerindo que muito provavelmente o tipo de anticorpos detetados pelo método ELISA não são neutralizantes, não conferindo proteção contra a infeção viral.

Futuramente, estes resultados merecem ser alargados com um maior número de amostras incluindo mais amostras negativas para a presença de anticorpos específicos de PCV2, para ser possível uma comparação adequada entre anticorpos e quantificação viral, uma vez que os resultados obtidos deixaram dúvidas quanto a esta relação.

5. Referências bibliográficas

- Abbas, A. & Lichtman, A. (2007). Respostas Imunes Humorais *In* Imunologia Básica. 4ª edição. 135-156. Elsevier.
- Allan, G.; McNeilly, F.; Kennedy, S.; Daft, B.; Clarke, E.; Ellis, J.; Haines, D.; Meehan, B.; Adair, B. (1998). Isolation of porcine circovirus- like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10, 3-10.
- Allan, G. & Ellis, A. (2000). Porcine circoviruses: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12, 3-14.
- Arya, M.; Shergill, I.; Williamson, M.; Gommersall, L. & Arya, N. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5, 1-11.
- Baekbo, P.; Kristensen, C. & Larsen, L. (2012). Porcine Circovirus Diseases: A review of PMWS. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59, 59-67.
- Cheung, A. (2012). Porcine circovirus: Transcription and DNA replication. *Virus Research*, 164, 46-53.
- Cheung, A. (2003a). The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. *Virology*, 313, 452-459.
- Cheung, A. (2003). Transcriptional Analysis of Porcine Circovirus Type 2. *Virology*, 305, 168-180.
- Christopher, L.; Lunney, C. & Lunney, J. (2012). Immune System *In* Disease of Swine. 10ª edition. 227-250. Willey Blackwell.
- Ellis, J.; Konoby, C.; West, K.; Allan, G.; Krakowka, S.; McNeilly, F.; Meehan, B. & Walker, I. (2001). Lack of antibodies to porcine circovirus type 2 virus in beef and dairy cattle and horses in western Canada. *The Canadian Veterinary Journal*, 42, 461-464.
- Ellis, J.; Krakowka, S.; Lairmore, M.; Haines, D.; Bratanich, A.; Clark, E.; Allan, G.; Konoby, C.; Hassard, L.; Meehan, B.; Martin, K.; Harding, J.; Kennedy, S. & McNeilly, F. (1999). Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11, 3-14.
- Ellis, J.; Hassard, L. & Clark, E. (1998). Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *The Canadian Veterinary Journal*, 39, 44-51.
- Engle, T.; Jobman, E.; Moural, T.; McKnife, A.; Bundy, J.; Barnes, S.; Davis, E.; Galeota, J.; Burkey, T.; Plastow, G.; Kachman, S. & Ciobanu, D. (2014). Variation in time and magnitude of immune response and viremia in experimental challenges with Porcine circovirus 2b. *BMC Veterinary Research*, 10, 1-11.
- Faurez, F.; Dory, D.; Grasland, B. & Jestin, A. (2009). Replication of porcine circoviruses. *Journal Virology*, 6, 1-8.
- Ferro, A. B. (2014). Imunohistoquímica. Amadeu Borges Ferro. Lisboa.

- Gan, S. D. & Patel, K. R. (2013). Enzyme Immunoassay and Enzyme- Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 133, 1-3.
- Giulietti, A.; Overbergh, L.; Valckx, D.; Decallonne, B.; Bouillon, R. & Mathieu, C. (2001). An Overview of Real- Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods*, 25, 386-401.
- Hamel, A. L.; Lin, L. L.; & Nayar, G. P. S. (1998). Nucleotide Sequence of Porcine Circovirus Associated with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Pigs. *Journal of Virology*, 72, 5262-5267.
- He, J.; Cao, J.; Zhou, N.; Jin, Y.; Wu, J. & Zhou, J. (2013). Identification and Functional Analysis of the Novel ORF4 Protein Encoded by Porcine Circovirus Type 2. *Journal of Virology*, 87, 1420-1429.
- Heid, C.; Stevens, J.; Livak, K. & Williams, P. (1996). Real Time Quantitative PCR. *Genome Research*, 986-994.
- Henriques, A.; Duarte, M.; Fagulha, T.; Ramos, F.; Barros, S.; Luís, T. & Fevereiro, M. (2011). Molecular study of porcine circovirus type 2 circulating in Portugal. *Infection Genetics and Evolution*, 11, 2162-2172.
- Jacobsen, B.; Krueger, L.; Seeliger, F.; Bruegmann, M.; Segalés, J. & Baumgaertner, W. (2009). Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Veterinary Microbiology*, 138, 27-33.
- Kiatipattanasakul, B.; Tantileartcharoen, E.; Katayama, K.; Suzuki, K.; Lekdumrogsak, T.; Nakayama, H. & Doi, K. (2002). Psittacine beak and feather disease in three captive sulphur-crested cockatoos (*Cacatua galerita*) in Thailand. *Journal Veterinary Medical Science*, 64, 527-529.
- Kim, J. & Chae, C. (2003). Multiplex nested PCR compared with in situ hybridization for the differentiation of porcine Circoviruses and porcine parvovirus from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 67, 133-137.
- Kim, J. & Chae, C. A. (2004). Comparison of virus isolation, polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in experimentally and naturally coinfecting pigs. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, 16, 45-50.
- Kiupel, M.; Stevenson, G.; Choi, J.; Latimer, K.; Kanitz, C. & Mittal, S. (2001). Viral Replication and Lesions in BALB/c Mice Experimentally Inoculated with Porcine Circovirus Isolated from a Pig with Postweaning Multisystemic Wasting Disease. *Veterinary Pathology*, 38, 74-82.
- Kubista, M.; Andrade, J.; Bengtsson, M.; Forootan, A.; Jonák, J.; Lind, K.; Sindelka, R.; Sjöback, R.; Sjögreen, B.; Strombom, L.; Stahlberg, A. & Zoric, N. (2006). The Real Time Polymerase Chain Reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 95-125.
- Larochelle, R.; Antaya, M.; Morin, M. & Magar, R. (2000). Typing of porcine Circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *Journal of Virology Methods*, 80, 69-75.

Larochelle, R.; Magar, R. & D'Allaire, S. (2003). Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 67, 114-120.

Leboffe, M. J. & Pierce, B. E. (2011). *A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory*. Morton Pub Comp, 8, 99-105.

Lin, C. N. et al. (2013). Comparison of viremia of type II porcine reproductive and respiratory syndrome virus in naturally infected pigs by zip nucleic acid probe-based real-time PCR. *BMC Veterinary Research*, 9, 1-6.

Liu, J.; Chen, I.; Du, Q.; Chua, H. & Kwang, J. (2006). The ORF3 Protein of Porcine Circovirus Type 2 is Involved in Viral Pathogenesis in Vivo. *Journal of Virology*, 80, 5065-5073.

Liu, Q.; Wang, L.; Willson, P. & Babiuk, A. (2000). Quantitative, Competitive PCR Analysis of Porcine Circovirus DNA in Serum from Pigs with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 3474-3477.

López-Soria, S.; Grau-Roma, L. & Segalés, J. (2008). Epidemiologia de la circovirosis porcine. *Suis*, 49, 14-23.

Madec, F.; Rose, N.; Graslan, B.; Cariolet, R. & Jestin, A. (2008). Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome and Other PCV2-Related Problems in Pigs: 12 year Experience. *Transboundary and Emerging Disease*, 55, 273-283.

Mankertz, A.; Caliskan, R.; Hattermann, K.; Hillenbrand, B.; Kurzendoerfer, P.; Mueller, B.; Schmitt, C.; Steinfeldt, T. & Finsterbusch, T. (2004). Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. *Veterinary Microbiology*, 98, 81-88.

McIntosh, K.; Harding, J.; Ellis, J. & Appleyard, G. (2006). Detection of Porcine circovirus type 2 viremia and seroconversion in naturally infected pigs in a farrow-to-finish barn. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 70, 58-61.

McKeown, N.; Opriessnig, T.; Thomas, P.; Guenette, D.; Elvinger, F.; Fenau, M.; Halbur, P. & Meng, X. (2005). Effects of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Maternal Antibodies on Experimental Infection of Piglets with PCV2. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12, 1347-1351.

McNair, I.; Marshall, M.; McNeilly, F.; Botner, A.; Vincent, I.; Herrmann, B.; Sanchez, R.; Rhodes, C. (2004). Interlaboratory testing of porcine sera for antibodies to porcine circovirus type 2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 16, 164-166.

McNeilly, F.; McNair, I.; O'Connor, M.; Brockbank, S.; Gilpin, D.; Lasagna, C.; Boriosi, G.; Meehan, B.; Ellis, J.; Krakowka, S. & Allan, G. (2002). Evaluation of a porcine circovirus type 2-specific antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs: comparison with virus isolation, immunohistochemistry, and the polymerase chain. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14, 106-112.

Meehan, B. M.; McNeilly, F.; Todd, D.; Kennedy, S.; Jewhurst, V.; Ellis, J.; Hassard, L.; Clark, E.; Haines, D. & Allan, G. (1998). Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal of General Virology*, 79, 2171-2179.

- Meerts, P.; Misinzo, G.; Lefebvre, D.; Nielsen, J.; Botner, A.; Kristensen, C. & Nauwynck, H. (2006). Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus type 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. *BMC Veterinary Research*, 30, 2-6.
- Meng, X.-J., (2013). Porcine Circovirus Type 2 (PCV2): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annual Review of Animal Biosciences*, 1, 43-64.
- Morozov, I.; Sirinarumitr, T.; Sorden, S.; Halbur, P.; Morgan, M.; Yoon, K. & Paul, P. (1998). Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 2535-2541.
- Murphy, K.; Travers, P. & Walport, M. (2010). *Imunologia de Janeway*. 7^a edition. Artmed.
- Murray, P.; Rosenthal, K. & Pfaller, M. (2010). *Respostas Imune Humorais In Microbiologia Médica*. 442-476. Elsevier.
- Nawagitgul, P.; Harms, P. & Morozov, I. (2002). Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)- based enzyme- linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9, 33-40.
- Olvera, A.; Cortey, M. & Segalés, J. (2007). Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: Phylogeny and clonality. *Virology*, 357, 175-185.
- Olvera, A.; Sibila, M.; Calsamiglia, M.; Segalés, J. & Domingo, M. (2004). Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *Journal of Virology Methods*, 117, 75-80.
- Opriessnig, T.; Patterson, A.; Jones, D.; Juhan, N.; Meng, X. & Halbur, P. (2009). Limited susceptibility of three different mouse (*Mus musculus*) lines to porcine circovirus- 2 infection and associated lesions. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 73, 81-86.
- Opriessnig, T.; Patterson, A.; Madson, D.; Pal, N.; Rothschild, M.; Kuhar, D.; Lunney, J.; Juhan, N.; Meng, X. & Halbur, P. (2009). Difference in severity of porcine circovirus type two- induced pathological lesions between Landrace and Pietrain pigs. *Journal of Animal Science*, 87, 1582-1590.
- Opriessnig, T.; Meng, X. J. & Halbur, P. G. (2007). Porcine circovirus type 2- associated disease: Update on current terminology, clinical manifestation, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19, 591-615.
- Opriessnig, T.; Yu, S.; Tracker, E. & Halbur, P. (2004). Derivation of porcine circovirus type 2- negative pigs from positive breeding herds. *Journal Swine Health Production*, 12, 186-191.
- Opriessnig, T.; Yu, S.; Gallup, J.; Ecans, R.; Fenaux, M.; Pallares, F.; Thacker, E.; Brockus, C.; Ackermann, M.; Thomas, P.; Meng, X.; Halbur, P. (2003). Effect of Vaccination with Selective Bacterins on Conventional Pigs Infected with Type 2 Porcine Circovirus. *Veterinary Pathology*, 40, 521-529.

- Perestrelo, R. (2009). Circovirose suína *In* vetmonografias, 1-16.
- Pogranichnyy, R.; Yoon, K.; Harms, P.; Swenson, S.; Zimmerman, J. & Sorden, S. (2000). Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection. *Viral Immunology*, 13, 143-153.
- Royer, R.; Nawagitgul, P.; Halbur, P. & Paul, P. (2001). Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. *Journal Swine Health Production*, 9, 281-284.
- Segalés, J.; Allan, G. & Domingo, M. (2012). Porcine Circoviruses *In* Disease of Swine. 10^a edition. 405-417. Wiley Blackwell
- Segalés, J.; Calsamiglia, M.; Olvera, A.; Sibila, M.; Badiella, L. & Domingo, M. (2005). Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Microbiology*, 111, 223-229.
- Sorden, S. D. (2000). Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal Swine Health Production*, 8, 133-136.
- Steiner, E.; Balmelli, C.; Herrmann, B.; Summerfield, A.; McCullough et al. (2008). Porcine circovirus type 2 displays pluripotency in cell targeting. *Virology*, 378, 311-322.
- Tenreiro, A.; Chaves, S. & Tenreiro, R. (2014). Princípios básicos da detecção e análise de ácidos nucleicos *In* Abordagens Moleculares em Veterinária. 3-31. Lidel. Lisboa.
- Vincent, I.; Carrasco, C.; Herrmann, B.; Meehan, B.; Allan, G.; Summerfield, A. & McCullough, K. (2003). Dendritic Cells Harbor Infectious Porcine Circovirus Type 2 in the Absence of Apparent Cell Modulation or Replication of the Virus. *Journal of Virology*, 77, 13288-13300.
- Walker, I.; Konoby, C. & Jewhurst, V. (2000). Development and application of a competitive enzymelinked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12, 400-405.
- Yue, F.; Cui, S.; Zhang, C. & Yoon, K. J. (2009). A multiplex PCR for rapid and simultaneous detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, porcine pseudorabies virus, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in clinical specimens. *Virus Genes*, 38, 392-397.
- Zhai, S.; Chen, S.; Xu, Z.; Tang, M.; Wang, F. & Li, X. (2004). Porcine circovirus type 2 in China: an update on and insights to its prevalence and control. *Virology Journal*, 11, 1-13.

Anexo I- Leituras ELISA

Exploração A

Amostras	Placa IgG		Placa IgM		Interpretação
	Valor OD	Res.	Valor OD	Res.	
ctr-	0,148	-	0,233	-	Cut off IgG= 0,901
ctr-	0,148	-	0,234	-	
ctr+	3,004	+	2,641	+	Cut off IgM= 1,057
ctr+	3,005	+	2,642	+	
1	0,938	+	0,244	-	infecção tardia
2	1,574	+	0,450	-	infecção tardia
3	0,680	-	0,474	-	-
4	1,181	+	0,384	-	infecção tardia
5	0,651	-	0,932	-	-
6	1,048	+	0,291	-	infecção tardia
7	1,612	+	0,649	-	infecção tardia
8	0,480	-	0,287	-	-
9	1,483	+	1,389	+	infecção recente
10	0,314	-	0,341	-	-
11	2,225	+	0,382	-	infecção tardia
12	0,231	-	0,230	-	-
13	0,453	-	0,587	-	-
14	1,186	+	0,421	-	infecção tardia
15	0,666	-	0,798	-	-
16	0,303	-	0,463	-	-
17	2,398	+	0,526	-	infecção tardia
18	2,218	+	0,552	-	infecção tardia

Amostras	Placa IgG		Placa IgM		Interpretação
	Valor OD	Res.	Valor OD	Res.	
19	1,696	+	0,328	-	infecção tardia
20	0,236	-	0,415	-	-
21	1,978	+	1,470	+	infecção recente
22	0,382	-	0,392	-	-
23	3,022	+	2,806	+	infecção recente
24	1,347	+	1,227	+	infecção recente
25	2,025	+	1,487	+	infecção recente
26	0,369	-	0,411	-	-
27	1,154	+	0,776	-	infecção tardia
28	2,076	+	1,064	+	infecção recente
29	2,525	+	0,911	-	infecção tardia
30	0,976	+	0,416	-	infecção tardia
31	2,936	+	1,115	+	infecção recente
32	1,269	+	0,360	-	infecção tardia
33	1,371	+	2,481	+	infecção ativa
34	0,418	-	0,492	-	-
35	2,862	+	1,808	+	infecção recente
36	2,235	+	0,632	-	infecção tardia
37	2,343	+	0,613	-	infecção tardia
38	2,137	+	0,606	-	infecção tardia
39	2,362	+	0,432	-	infecção tardia
40	2,032	+	0,523	-	infecção tardia

Exploração B

Amostras	Placa IgG		Placa IgM		Interpretação
	Valor OD	Res.	Valor OD	Res.	
ctr-	0,111	-	0,185	-	Cut off IgG= 0,712
ctr-	0,123	-	0,192	-	
ctr+	2,333	+	2,257	+	Cut off IgM= 0,904
ctr+	2,411	+	2,261	+	
41	3,290	+	0,900	-	infecção tardia
42	2,356	+	1,353	+	infecção recente
43	3,273	+	0,797	-	infecção tardia
44	3,043	+	0,824	-	infecção tardia
45	2,318	+	1,072	+	infecção recente
46	3,182	+	1,007	+	infecção recente
47	3,136	+	2,529	+	infecção recente
48	2,037	+	0,419	-	infecção tardia
49	3,060	+	0,707	-	infecção tardia
50	2,326	+	0,883	-	infecção tardia
51	3,221	+	0,987	+	infecção recente
52	3,048	+	0,851	-	infecção tardia
53	2,280	+	0,866	-	infecção tardia
54	2,554	+	1,552	+	infecção recente
55	3,247	+	0,937	+	infecção recente

Amostras	Placa IgG		Placa IgM		Interpretação
	Valor OD	Res.	Valor OD	Res.	
56	3,153	+	0,775	-	infecção tardia
57	2,528	+	1,146	+	infecção recente
58	2,265	+	0,847	-	infecção tardia
59	3,111	+	0,958	+	infecção recente
60	3,148	+	0,967	+	infecção recente
61	2,967	+	0,954	+	infecção recente
62	3,261	+	0,731	-	infecção tardia
63	1,170	+	0,875	-	infecção tardia
64	0,682	-	0,785	-	-
65	1,297	+	0,852	-	infecção tardia
66	0,643	-	0,902	-	-
67	2,425	+	0,655	-	infecção tardia
68	2,383	+	0,625	-	infecção tardia
69	2,363	+	0,634	-	infecção tardia
70	2,135	+	0,606	-	infecção tardia
71	2,307	+	0,451	-	infecção tardia
72	2,087	+	0,459	-	infecção tardia
73	2,311	+	0,743	-	infecção tardia

Exploração C

	Placa IgG		Placa IgM		Interpretação
Amostras	Valor OD	Res.	Valor OD	Res.	
ctr-	0,185	-	0,251	-	Cut off IgG= 0,597 Cut off IgM= 0,795
ctr-	0,184	-	0,270	-	
ctr+	1,985	+	1,998	+	
ctr+	1,996	+	1,979	+	
74	1,498	+	0,687	-	infecção tardia
75	0,714	+	0,799	+	infecção ativa
76	1,814	+	0,845	+	infecção recente
77	1,524	+	0,381	-	infecção tardia
78	1,736	+	0,966	+	infecção recente
79	1,198	+	0,980	+	infecção recente
80	1,827	+	0,859	+	infecção recente
81	1,473	+	0,479	-	infecção tardia
82	1,966	+	1,417	+	infecção recente
83	1,523	+	1,120	+	infecção recente
84	1,445	+	0,634	-	infecção tardia
85	1,002	+	0,552	-	infecção tardia
86	0,473	-	0,479	-	-
87	1,327	+	0,626	-	infecção tardia

	Placa IgG		Placa IgM		Interpretação
Amostras	Valor OD	Res.	Valor OD	Res.	
88	1,793	+	0,676	-	infecção tardia
89	1,124	+	0,651	-	infecção tardia
90	2,133	+	1,397	+	infecção recente
91	1,152	+	0,714	-	infecção tardia
92	1,573	+	0,700	-	infecção tardia
93	2,367	+	0,725	-	infecção tardia
94	1,980	+	0,758	-	infecção tardia
95	1,908	+	1,042	+	infecção recente
96	1,442	+	0,885	+	infecção recente
97	1,596	+	0,552	-	infecção tardia
98	1,821	+	0,509	-	infecção tardia
99	0,925	+	0,439	-	infecção tardia
100	2,341	+	0,516	-	infecção tardia
101	2,292	+	0,668	-	infecção tardia
102	2,258	+	0,531	-	infecção tardia
103	2,250	+	0,560	-	infecção tardia
104	2,417	+	0,408	-	infecção tardia
105	1,610	+	0,493	-	infecção tardia

Anexo II- Leituras qPCR

Ensaio 1

Amostras	Quantificação	Ct FAM	Ct VIC	Amostras	Quantificação	Ct FAM	Ct VIC
NCS	Negativo	N/A	28,12	15	1,95E+06	27,86	26,23
St *	1,00E+10	15,2		19	1,93E+06	27,88	26,81
St ^{-1*}	1,00E+09	18,75		21	1,98E+06	27,83	27,83
St ^{-2*}	1,00E+08	20,9		23	6,98E+07	22,39	27,35
St ^{-3*}	1,00E+07	24,8		24	1,31E+05	31,99	27,33
St ^{-4*}	1,00E+06	29,3		25	2,20E+05	31,19	26,16
St ^{-5*}	1,00E+05	32,6		27	2,40E+05	31,06	25,55
St ^{-6*}	1,00E+04	35,98		28	2,62E+05	30,92	27,35
1	2,06E+06	27,78	26,55	29	2,59E+04	34,46	29,50
2	2,40E+05	31,06	26,76	31	3,26E+05	30,59	26,81
4	2,61E+05	30,93	26,75	32	4,15E+05	30,22	29,30
6	1,30E+06	28,48	26,73	33	9,21E+06	25,49	26,49
7	2,04E+06	27,79	26,39	35	1,60E+06	28,16	26,46

*St- Standart

Ensaio 2

Amostras	Quantificação	Ct FAM	Ct VIC	Amostras	Quantificação	Ct FAM	Ct VIC
NCS	Negativo	N/A	28,29	52	Negativo	N/A	27,64
St *	1,00E+10	15,32		53	Negativo	N/A	28,18
St ^{-1*}	1,00E+09	18,62		54	1,22E+07	25,01	26,32
St ^{-2*}	1,00E+08	21,01		55	3,55E+06	26,87	27,36
St ^{-3*}	1,00E+07	24,95		56	7,71E+04	32,63	26,92
St ^{-4*}	1,00E+06	26,64		57	3,40E+06	26,93	27,25
St ^{-5*}	1,00E+05	31,43		58	3,58E+04	33,78	27,82
St ^{-6*}	1,00E+04	36,21		59	6,97E+03	36,24	26,98
41	Negativo	N/A	27,86	60	1,64E+07	24,57	26,24
42	5,22E+06	26,29	26,35	61	Negativo	N/A	26,54
43	1,97E+06	27,75	26,28	62	Negativo	N/A	27,32
44	4,09E+06	26,65	26,93	75	2,68E+06	27,29	27,06
45	1,70E+04	34,9	29,94	76	1,47E+06	28,19	27,14
46	5,45E+04	33,15	27,26	79	3,90E+06	26,73	27,38
47	3,55E+06	26,87	27,49	80	3,78E+06	26,77	26,39
48	1,61E+04	34,98	27,41	82	8,04E+06	25,64	26,99
49	1,66E+06	28,01	27,40	83	1,80E+04	34,81	27,33
50	8,97E+07	22,01	26,60	86	Negativo	N/A	28,28
51	2,66E+06	27,3	27,61	90	6,68E+04	32,84	27,91

*St- Standart

Ensaio 3

Amostrs	Quantificação	Ct FAM	Ct VIC
NCS	Negativo	N/A	28,09
St *	1,00E+10	14,9	
St ^{-1*}	1,00E+09	17,9	
St ^{-2*}	1,00E+08	20,7	
St ^{-3*}	1,00E+07	24,4	
St ^{-4*}	1,00E+06	27,5	
St ^{-5*}	1,00E+05	31,1	
St ^{-6*}	1,00E+04	35,8	

*St- Standard

Amostrs	Quantificação	Ct FAM	Ct VIC
12	Negativo	N/A	30,40
13	Negativo	N/A	29,80
16	Negativo	N/A	28,40
22	Negativo	N/A	26,90
34	Negativo	N/A	28,90
38	3,25E+05	29,71	27,20

Ensaio 4

Amostrs	Quantificação	Ct FAM	Ct VIC
NCS	Negativo	N/A	27,83
St *	1,00E+10	14,52	
St ^{-1*}	1,00E+09	17,6	
St ^{-2*}	1,00E+08	21,03	
St ^{-3*}	1,00E+07	23,91	
St ^{-4*}	1,00E+06	28,23	
St ^{-5*}	1,00E+05	31,8	
St ^{-6*}	1,00E+04	35,44	

*St- Standard

Amostrs	Quantificação	Ct FAM	Ct VIC
3	Negativo	N/A	26,99
5	Negativo	N/A	25,85
10	Negativo	N/A	27,06
20	Negativo	N/A	28,33
26	Negativo	N/A	26,15